

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Dinamismo evolutivo en genomas reducidos: análisis genético
molecular del microsporidio "Nosema ceranae"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

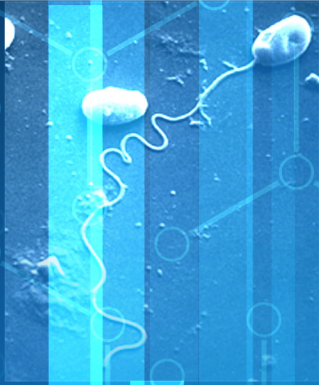
PRESENTADA POR

Soledad Sagastume de Andrés

Directores

Nuno Henriques-Gil
Mariano Higes Pascual

Madrid, 2015



Dinamismo Evolutivo
en Genomas Reducidos

**Análisis Genético Molecular del
*Microsporidio Nosema ceranae***

TESIS DOCTORAL
Soledad Sagastume de Andrés
Madrid 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

TESIS DOCTORAL

Soledad Sagastume de Andrés

Madrid 2015

El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en la Universidad CEU San Pablo y en el Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (CAR), bajo la dirección de los doctores Nuno Henriques-Gil y Mariano Higes Pascual, como parte del proyecto INIA RTA 2009-00057. Asimismo, la autora ha disfrutado de una beca predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Veterinaria). El tutor de este trabajo ha sido el profesor doctor Cesar Benito Jiménez, del departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM.

NUNO HENRIQUES-GIL, doctor en Biología
Y
MARIANO HIGES PASCUAL, doctor en Veterinaria

Informan:

Que Soledad Sagastume de Andrés, licenciada en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “DINAMISMO EVOLUTIVO EN GENOMAS REDUCIDOS: ANÁLISIS GENÉTICO MOLECULAR DEL MICROSPORIDIO *NOSEMA CERANAE*”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento dos artículos en dos revistas del *Science Citation Index: Environmental Microbiology* y *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, estando pendiente de aceptación una tercera en *Infection, Genetics and Evolution*.

De lo que informamos en Madrid, a 1 de Diciembre de 2014.

Fdo. D. Nuno Henriques-Gil
Catedrático del CEU

Fdo. D. Mariano Higes Pascual
Asesor Investigación CAR

Agradecimientos

Muchas gracias a la Universidad CEU San Pablo, al Centro Apícola Regional de la Consejería de Agricultura de Castilla La Mancha y a las Facultades de Veterinaria y Biología de la Universidad Complutense de Madrid, por su apoyo y su ayuda para la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis, Nuno y Mariano. A Nuno muchísimas gracias por enseñarme todo lo que sé sobre Genética, desde mis primeras asignaturas en la carrera de Farmacia hasta mi formación como profesora en la Universidad, pasando por toda una tesis. Muchas gracias por transmitirme la pasión por la investigación clásica, por meter ese “por qué” constante en mi cabeza, por abrirme el camino hacia el pensamiento objetivo, por enseñarme cómo se escribe un artículo científico sin especular, por las tantas y tantas charlas de café con cientos de ideas plasmadas en servilletas, y por todo el trabajo codo con codo de todos estos años. A Mariano, millones y millones de gracias por creer en mí, por acogerme en su laboratorio y su equipo desde el primer día como una más, por darme alas para diseñar mis propios experimentos, por poner a mi alcance aparatos y técnicas que sólo unos pocos privilegiados pueden utilizar, por su fuerza y pasión al mostrarme el gran mundo de las abejas que no se vislumbra a través de las pipetas y tubos de un laboratorio lejos de las colmenas; por adentrarme en el mundo de *Nosema* a través de la microscopía electrónica y enseñarme un microscopio electrónico, por infectar las abejas de mis experimentos locos con microscopía confocal, por los múltiples cursos que he realizado de su mano y que tanto bien le han hecho a mi formación, y por su incansable apoyo y cariño todos estos años. Millones de gracias a los dos, por vuestro saber, por vuestro tiempo, vuestra dedicación y por brindarme las herramientas para realizar este trabajo, que no existiría sin vosotros.

A Raquel: muchas gracias, muchas gracias, muchas gracias y muchas gracias por tu tiempo, por compartir tu trabajo conmigo, por tus horas dedicadas al microscopio confocal, las del microdisector de esporas, por enseñarme tus diseños de q-PCR, por transmitirme la sensibilidad de lo que es trabajar con animales vivos, por llevarme de congreso, y por tu alegría, tu apoyo y tu paciencia conmigo. De corazón, muchas gracias Raquel.

Al Doctor Nicolas Corradi por toda su información sobre genomas de microsporidios y genes de meiosis, por el tiempo dedicado a mis secuencias y por abrirme la mente hacia nuevas hipótesis.

A mis compañeras del laboratorio de Genética y Biología Molecular del CEU. A María MF por enseñarme la disciplina de trabajo que nunca he abandonado, a hacer una PCR, a llevar un cuaderno, a hacer geles de agarosa, por enseñarme a ser meticulosa y tranquila mientras trabajo, y sobre todo, por su grandísima paciencia. A Eva, Tete y María Haro por sus secuencias de Genyca, por enseñarme a diseñar primers, a clonar, a recortar bandas de ADN de un gel, por su tiempo y su dedicación personal y por parar su estresante ritmo diario sólo por ayudarme. A Elisabet, María José y Lourdes, mis queridas niñas, muchísimas gracias por ayudarme en los buenos y en los malos momentos, por vuestros grandes consejos, por ser las grandísimas compañeras de laboratorio que habéis sido (ese compañerismo no tiene precio) y por las miles de anécdotas que tenemos entre tubos y micropipetas, que hicieron de mis años en el CEU un regalo.

A mis compañeras del laboratorio de Marchamalo. A Cristina Botías, muchas gracias por enseñarme a utilizar todos los aparatos del laboratorio, por ayudarme a desenvolverme en un sitio nuevo, por su tesis -que ha sido, sin duda, mi gran referencia para escribir esta- y por ser tan buenísima compañera. ¡A mi querida Carmen Carmen! Por esas manos diestras infectando abejas en mis experimentos, por purificar y cuantificar todas y cada una de las muestras de esporas, por tu alegría, por tus cánticos, por el cigarrito de las 11.00 y por ser mi confidente. A Mari Carmen, muchas gracias por ayudarme con el clonaje de tantas y tantas muestras, por tu profesionalidad, tu dedicación y tu cariño. A mi querida Almudena Cepero, por su alegría, su sonrisa, su desorden (que tanto me hizo reír), y por toda la información sobre parásitos raros de las abejas que me facilitó. A Virginia y Tere, muchas gracias por haberme hecho sentir tan bien en Marchamalo, desde el primer día que llegué solo he recibido cariño, ayuda y disposición hacia todo lo que necesitara.... Y a todas las que llegaron más tarde, con las que he tenido el placer de compartir momentos estupendos. Muchísimas gracias, chicas, muchísimas gracias a todas por todos estos años.

A mis queridísimos, queridísimos, queridísimos padres, sufridores y víctimas de esta tesis, muchas gracias por TODO. Gracias Mamá por guardar mis “porquerías de ADNs” en tu

congelador tantas y tantas veces, por financiarme, por tu comprensión ante mis agobios, por aguantar mis prontos y por los días libres de farmacia cuando he necesitado escribir. Gracias Papá por tus buenos consejos, por esas grandes palabras de aliento cuando todo salía mal, por los dos ordenadores que guardan fielmente muchos años de mi trabajo en el laboratorio, por darme todo lo que necesitaba en cada momento y por tu gran ejemplo de constancia y perseverancia en el trabajo. Muchas gracias a los dos por sentir cada uno de mis éxitos como el mayor del mundo, y sentir en el alma cada una de mis derrotas. Muchas gracias por aguantar las largas sobremesas de genética, microsporidios y abejas, por las comidas, botellas de Dom Pérignon para celebrar cada publicación aceptada, por vuestra generosidad y vuestra paciencia. Gracias por haber hecho posible esta tesis.

A mi queridísima hermana. Muchas gracias por creer en mí, Julia. Muchas gracias por hacer aún más importante cada descubrimiento de este trabajo, gracias por haberme hecho sentir que podía con todo durante todos estos años, por tus ánimos interminables y tu apoyo incondicional en todo momento.

A mi querida y añorada Abuela, a la que echo mucho de menos. Muchas gracias por cada minuto que has dedicado a mi trabajo, por aguantar con una paciencia admirable mis ensayos del DEA, por regalarme la palabra exacta que buscaba cuando empecé a escribir esta tesis, por ser mi psicóloga y por toda tu dedicación durante toda mi vida. Espero que, desde donde estés, te sientas orgullosa de mí.

A toda mi familia. A mis tíos y primos, por su apoyo, por su energía, por su amor, por su cercanía en lo bueno y en lo malo y por aguantar mis rollos de bichos; a mi tía de mi alma un agradecimiento especial por su entusiasmo, por las decenas y decenas de abejas que tengo en mi casa ¡y ese gran cojín de microsporidios! Muchas gracias a mi Tía Ingrid, a Domi y a Juana por echarme una mano con el inglés, y a mi primo Fernando por ayudarme con todo el maquetado de la tesis. A mis primas Cristina, Nuria y Juana, miles de gracias por su preocupación, por su apoyo, por sus risas, por su alegría y por estar siempre a mi lado. A todos, muchas gracias por quererme tanto.

A mis amigas Lola, Paula y Alicia, por todo el consuelo y el ánimo que, a veces incluso sin saberlo, me han transmitido para no tirar la toalla durante estos años. Muchas gracias a

Almudena por ayudarme a desconectar cuando más lo necesitaba y por poner todo su entusiasmo y alegría en cada bache superado para acabar este trabajo.

Y finalmente, muchas gracias a todas aquellas personas de los centros implicados en la realización de esta tesis que me han ayudado, enseñado, y facilitado el trabajo. Gracias a mi tutor de la UCM César Benito, a Carlos Bocos, a Paola, a Carmen del Águila, a Aranzazu Meana, a Pilar García-Palencia, y a Rosa de Secretaría de Doctorado.

“Mi consejo a los estudiantes de ciencia es que si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica, adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios: ¡hazlo! Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro.”

Severo Ochoa

A mi Abuela

Índice

PRÓLOGO Y OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1. Genomas reducidos	13
- <i>Introducción</i>	
- <i>La paradoja del tamaño de los genomas</i>	
- <i>Reducción y compactación de un genoma</i>	
- <i>El genoma de los microsporidios</i>	
2. Los microsporidios	22
- <i>Características celulares</i>	
- <i>Ribosomas y genes ribosómicos</i>	
- <i>Ciclo biológico</i>	
- <i>Reproducción sexual en microsporidios</i>	
- <i>Taxonomía</i>	
- <i>Vías de transmisión</i>	
3. El género <i>Nosema</i>	35
- <i>Filogenias moleculares en <i>Nosema</i>: controversia con <i>Vairimorpha</i></i>	
- <i>Meiosis en <i>Nosema</i></i>	
- <i>Relevancia de las nosemosis</i>	
4. Problemática en la apicultura	41
5. <i>Nosema ceranae</i>	46
- <i>Características generales</i>	
- <i>Reproducción sexual</i>	
- <i>Genes ribosómicos</i>	
- <i>Genoma</i>	
- <i><i>N. ceranae</i> como agente patógeno en la nosemosis tipo C</i>	
- <i>Epidemiología de la nosemosis tipo C</i>	

CAPÍTULO I	59
<i>Análisis Preliminar del rDNA de <i>Nosema ceranae</i></i>	
Apéndice I	81
Apéndice II	93
CAPÍTULO II	105
<i>Polimorfismo y recombinación en el rDNA del microsporidio supuestamente asexual <i>Nosema ceranae</i>, patógeno de abejas de la miel</i>	
CAPÍTULO III	121
<i>Análisis de distintas secuencias del 16S rRNA expresadas en el parásito de la abeja de la miel <i>Nosema ceranae</i> (Microsporidia)</i>	
CAPÍTULO IV	135
<i>Diversidad genotípica en <i>Nosema ceranae</i>, parásito de la abeja de la miel: ¿aislados formados por múltiples cepas, procesos sexuales ocultos o ambos casos?</i>	
DISCUSIÓN GENERAL	155
CONCLUSIONES	169
RESUMEN	171
ABSTRACT	179
BIBLIOGRAFÍA	187

Prólogo y Objetivos

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:
Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

A lo largo del siglo XX, particularmente en la segunda mitad, las ciencias basadas en el estudio del material genético se han desarrollado de forma muy rápida, y han evolucionado hacia lo que hoy son tres disciplinas: genética, genómica y biología molecular.

Haciendo un rápido resumen histórico, la genética nace con los estudios de Mendel en 1866, y su estudio de la herencia y la definición de lo que hoy conocemos como “genes” constituyó el fundamento de la genética, entendida hoy como “el estudio de la herencia y la variación” (Klug y col., 2006). A principios del siglo XX comienzan los estudios cromosómicos y se define el “núcleo celular” como una estructura citológica formada por ADN y proteínas. Es en 1920 cuando el profesor de botánica Hans Winkler acuña el término “genoma” como un acrónimo de las palabras “gen” y “cromosoma” (Lederberg y McCray, 2001). Aun así, la genómica propiamente dicha tuvo su origen en la década de 1970 con la tecnología del ADN recombinante (Klug y col., 2006). El descubrimiento de la doble hélice de ADN y la complementariedad de las dos hebras por Watson y Crick en 1953, fue sin duda uno de los grandes descubrimientos del siglo XX, y dio pie al nacimiento de la biología molecular. Inicialmente, se consideró esta última disciplina como “la batería de herramientas para llevar a cabo estudios genéticos”, lo que hoy en día supone un concepto algo descorazonador para muchos científicos, ya que su gran desarrollo durante los últimos años la ha convertido en una disciplina propia (Ehrenberg y col., 2006). Fue en las décadas de 1970 y 1980 cuando las técnicas de ADN recombinante y el desarrollo de la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) revolucionaron literalmente la investigación en genética y en biología molecular, e impulsaron el gran desarrollo de las disciplinas genéticas que hoy conocemos.

Pero otro de los grandes avances de estos últimos años es el hecho de que las ciencias genéticas, más allá de sus propios campos, han puesto sus herramientas al servicio de otras disciplinas, coordinándose y complementándose con ellas, es decir, formando estudios multidisciplinarios. De hecho, a raíz de este concepto de interacción entre técnicas en estudios biológicos, nace lo que hoy se conoce como “biología de sistemas”. Esta nueva disciplina ha emergido de las ciencias biológicas en los primeros años del siglo XXI con la evidencia de que un hecho cualquiera puede ser estudiado desde varios campos esencialmente diferentes, pero que al enfocarse hacia el mismo punto, ofrecen resultados

complementarios y una visión del estudio más amplia. En el año 2006, Ehrenberg y colaboradores definieron la biología de sistemas como el desarrollo de un extenso y variado número de herramientas para el estudio dinámico de los sistemas vivos, y la aplicación de sus contenidos para resolver distintos problemas científicos. Utilizando herramientas de varias disciplinas para un mismo fin, los resultados obtenidos proporcionan una información más global, al contrario que en estudios individuales basados en una sola técnica, donde los resultados pueden ser muy precisos, pero “estáticos” desde un punto de vista biológico. Un buen ejemplo de lo que significa la biología de sistemas sería la bioinformática, en la cual, las nuevas tecnologías informáticas se han combinado con la biología molecular para dar lugar a las bases en las que se apoyan los estudios genómicos. Pero, a su vez, estos últimos precisan del apoyo de otras disciplinas, como física, matemáticas, análisis numéricos y procesos estocásticos, para poder analizar, por ejemplo, las relaciones fenotipo/genotipo de un organismo (Ehrenberg y col., 2006).

Con el concepto multidisciplinar presente, las tres disciplinas genéticas han contribuido eficazmente durante años al avance de diversos campos, como son la biomedicina, agricultura, ganadería, bioinformática, microbiología... de hecho, la técnica de PCR se ha convertido en una de las más versátiles de la genética moderna, siendo a día de hoy un método rutinario de control en alimentación, diagnóstico e identificación de microorganismos, análisis de cultivos celulares, pruebas concluyentes en procesos judiciales...

Tanto los grandes avances en genética, genómica y biología molecular, como la versatilidad de sus herramientas, han provocado que muchos aspectos ajenos al estudio de los ácidos nucleicos sean abordados desde estas tres disciplinas genéticas.

El estudio de los microorganismos es, en ocasiones, una tarea difícil de abordar, sobre todo en el caso de organismos unicelulares y particularmente, de parásitos intracelulares. Durante años, la microscopía fue la técnica por excelencia para el estudio de estos organismos, y a lo largo del siglo XX ha ido evolucionando gracias a las nuevas tecnologías. La resolución de esta técnica no sólo ha mejorado con la aparición de la

microscopía electrónica, sino que las herramientas informáticas asociadas a microscopía han supuesto un grandísimo avance. De hecho, una gran cantidad y variedad de microscopios no se conciben hoy en día sin un equipo informático y un software integrados. Además de la informática, las técnicas de fluorescencia asociadas a inmunología en estudios de marcaje con anticuerpos monoclonales, junto con la aparición de los cultivos celulares han supuesto un avance muy significativo en estudios de parásitos en vivo. Con la llegada de la genética, las herramientas moleculares se pusieron también al servicio de la microscopía haciendo, por ejemplo, que estudios microscópicos con sondas de ADN marcadas en casos de identificación de proteínas, estructuras celulares y marcadores cromosómicos, estén actualmente muy consolidados.

Pero los estudios de parasitología se han visto implementados con las herramientas genéticas más allá de la aportación de éstas a la microscopía. El estudio de ciertos marcadores genéticos no sólo se ha convertido en los últimos años en un pilar importante a la hora de clasificar filogenéticamente un organismo, sino que la genética, biología molecular y genómica aportan información sobre mecanismos celulares, rutas metabólicas, comportamiento biológico e historia evolutiva del organismo estudiado. Esto hace que, actualmente, estas técnicas moleculares estén presentes en un gran número de estudios de parásitos.

En el año 2006, Higes y colaboradores describieron la presencia de un nuevo patógeno en la abeja melífera occidental (*Apis mellifera*) cuya presencia en las colonias de abejas se asoció con el fenómeno de mortalidad masiva de las mismas, que sacudía la apicultura mundial en esos años. Este parásito exótico en Europa se identificó como *Nosema ceranae*, pertenece al grupo de los microsporidios y fue descrito por Fries y colaboradores en el año 1996 como parásito habitual de la abeja oriental, *Apis cerana*.

Desde su descubrimiento hace 150 años, los microsporidios han captado tanta atención en investigación, como controversia han creado en el mundo científico. Estos organismos están descritos como hongos parásitos unicelulares que precisan de una célula hospedadora para llevar a cabo su ciclo biológico (Wittner y Weiss, 1999; Adl y col., 2005, 2012; Lee y col., 2008). Los microsporidios poseen unas características muy peculiares, entre

las cuales se encuentra su pequeño genoma, fruto de una larga historia de parasitación intracelular, que hace que a día de hoy estos organismos no puedan subsistir sin explotar los recursos de una célula huésped. Además de la relevancia económica y medioambiental de las microsporidiosis, el pequeño tamaño del genoma de estos organismos ha abierto muchas líneas de investigación, ya que su proceso de reducción y compactación a lo largo de su historia evolutiva supone una base muy sólida para el estudio de genomas pequeños y creación de genomas sintéticos (Klasson y Andersson, 2010).

La detección de *N. ceranae* en *A. mellifera*, como se ha indicado, coincidió con un fenómeno de despoblamiento y colapso generalizado en colonias de abejas de todo el mundo. Este fenómeno se detectó por primera vez en Europa, y en menos de dos años, se convirtió en un problema a nivel mundial (Higes y col., 2005, 2006; Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007). Este suceso ha provocado un descenso generalizado en las poblaciones de abejas y otros himenópteros polinizadores, con la consecuente disminución drástica de las actividades apícolas en todo el hemisferio norte (vanEngelsdorp y Meixner, 2009; Potts y col., 2010). Además, *A. mellifera* desempeña un papel de gran importancia en el proceso de polinización, con lo cual, el descenso drástico y prolongado en el tiempo de las colonias de abejas melíferas y abejorros ha supuesto un grave peligro al equilibrio de ecosistemas. Así pues, la valoración de los daños causados, tanto desde un punto de vista económico como medioambiental, es muy negativa. Tras años de investigación, *N. ceranae* puede considerarse uno de los principales sospechosos de este fenómeno, siendo el agente etiológico de una nueva enfermedad denominada nosemosis tipo C (COLOSS 2009; Higes y col., 2010).

Desde su detección, *N. ceranae* ha sido una especie difícil de estudiar por varios motivos. El primero y más importante, es que no se han conseguido llevar a cabo cultivos celulares, ni con líneas de células conocidas, ni con las células ventriculares de la abeja, que son las dianas de *N. ceranae*. Esto imposibilita llevar a cabo análisis microscópicos en vivo del parásito, dificultando así el estudio de su ciclo biológico y de su acción patógena, y por otro lado, hace imprescindible el diseño de los análisis experimentales con abejas vivas, con los inconvenientes que esto supone. Aunque se han llevado a cabo estudios de microscopía electrónica para determinar la morfología de *N. ceranae* en cada momento de su ciclo

biológico (Higes y col., 2007), son muchas las dudas en cuanto al comportamiento, plasticidad, origen, virulencia y evolución que rodean a este microsporidio, y que no se han visto esclarecidas con técnicas de microscopía. En este punto es donde la genética, la biología molecular y la genómica han puesto sus herramientas al servicio de nuevos experimentos encaminados a resolver estos interrogantes.

En segundo lugar, y a nivel genético, otro factor influyó negativamente en el análisis de este parásito. *N. ceranae* había sido muy poco estudiado anteriormente, ya que la especie *A. cerana* no es demasiado relevante económicamente en el mundo de la apicultura, y el parásito no se mostró especialmente patógeno en esta especie hospedadora. Esto derivó en que, desde un principio, se supusiera un comportamiento y desarrollo similar a su homólogo europeo *Nosema apis*, parásito endémico de las abejas europeas. Ciertamente, este último era el microsporidio parásito habitual de *A. mellifera* y fue descrito como tal por Zander en 1909. Pero durante estos últimos años se ha demostrado que el comportamiento de ambos microsporidios, tanto a nivel de abeja individual, como a nivel de la colonia de abejas, es muy diferente (Higes y col., 2005, 2008a, 2009b; Paxton y col., 2007; Antúnez y col., 2009; Martín Hernández y col., 2009). Así pues, los análisis genéticos siguieron desde un principio un patrón equivocado y asumieron un comportamiento estereotipado de *N. ceranae* acorde con el grupo de los microsporidios, y en particular del género *Nosema*. Esto desembocó en estudios con resultados incongruentes y no reproducibles.

El marcador genético que más se ha utilizado en el estudio de estos parásitos es el rDNA. Los genes ribosómicos se han utilizado durante años como marcadores de diagnóstico e identificación de microorganismos basándose en la supuesta uniformidad de sus copias dentro de una misma especie (Nei y Rooney, 2005; Ueno y col., 2007), y en su naturaleza conservada gracias a procesos de homogeneización como la “evolución concertada” (Dover y Coen, 1981). Estos marcadores fueron la primera elección molecular para el diagnóstico de *N. ceranae*, lo que lo convirtió en un marcador de referencia. Así, el rDNA comenzó a utilizarse con otros fines, como la construcción de árboles filogenéticos y el estudio de variabilidad intraespecífica en busca de “cepas” dentro de *N. ceranae*. Esta idea ha sido muy perseguida por muchos investigadores ya que daría mucha información sobre el origen de la

introducción de este nuevo patógeno en Europa, la diseminación del parásito por todo el mundo, e incluso, una trazabilidad de su grado de virulencia.

Pero lejos de ser tan informativo como se esperaba, el estudio del rDNA en *N. ceranae* ha abierto muchos interrogantes alrededor de su reproducción asexual, su distribución natural por el mundo, su comportamiento y sus características poblacionales. Esto ha desembocado en la necesidad de búsqueda de nuevos marcadores moleculares y la realización de un proyecto genoma (Cornman y col., 2009).

El trabajo experimental de la presente tesis doctoral comenzó una vez detectado el microsporidio en Europa. Las observaciones en campo mostraron diferentes evoluciones de las colonias de abejas parasitadas (desde colonias asintomáticas a colonias colapsadas). Descartando la influencia decisiva de la distinta climatología del continente europeo, y la existencia de varias subespecies de abejas melíferas que podrían intervenir en la variación de la sintomatología, la distinta evolución clínica de la enfermedad se atribuyó principalmente a la existencia de “cepas” de mayor o menor virulencia del microsporidio. En aquel momento, menos de una decena de secuencias genéticas respondían a *N. ceranae* en *GenBank*, y se asentó la necesidad de hacer un estudio genético-molecular de este parásito, fundando así las bases de esta tesis. Desde entonces, el estudio de *N. ceranae* ha sido muy activo y un altísimo número de artículos científicos han aportado mucha información sobre él. Frente a este dinamismo, los objetivos de esta tesis se fueron modelando desde la búsqueda inicial de cepas asociadas a distinta virulencia, hasta el estudio y comportamiento poblacional de *N. ceranae*.

Por todo ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. El estudio del rDNA de *N. ceranae*, su variabilidad y su naturaleza recombinante.
2. Búsqueda de evidencias genéticas de reproducción sexual.
3. Estudio de las consecuencias de la variabilidad genética existente en los genes ribosómicos en el comportamiento de los ribosomas de *N. ceranae*.
4. Búsqueda de nuevos marcadores moleculares de copia única útiles en filogenias moleculares intraespecíficas.
5. Análisis del comportamiento poblacional de *N. ceranae*.

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Introducción General

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

1. Genomas reducidos

Introducción

Los estudios genómicos han ido creciendo progresivamente a lo largo de los últimos años gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN, los avances en bioinformática y las técnicas cada vez más sofisticadas para realizar análisis de genomas completos. El término “genoma” se acuñó en 1920, y provocó que los “genéticos” del momento cambiaran el estudio puramente individual de los genes, por centrarse en una imagen superior: el conjunto de genes que posee un organismo y que son responsables de proveerlo de todas las proteínas necesarias para su supervivencia, desde estructura celular hasta rutas metabólicas, pasando por toda la complejidad de los mecanismos celulares (Klug y col., 2006).

Con el paso de los años la disciplina genómica ha ido abarcando cada vez más campos y ampliando sus horizontes. La genómica estructural se encarga de la construcción de los datos de la secuencia del genoma, el descubrimiento de los genes, su localización y la construcción de mapas genéticos. Por otro lado, la genómica funcional estudia la función biológica de los genes, su regulación y sus productos. Y por último la genómica comparativa contrasta la secuencia de genes y proteínas de diferentes genomas para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre ellos, al igual que ayuda a desarrollar organismos modelo (Klug, y col., 2006).

Numerosos proyectos han hecho posible que, a día de hoy, se conozca la secuencia completa de centenares de genomas de procariotas y eucariotas, siendo el caso más trascendental el Proyecto Genoma Humano (Lander y col., 2001). Pero actualmente hay más de mil proyectos genoma en ejecución encaminados a campos tan diversos como la biomedicina, la agricultura, la ganadería y la bioinformática, entre otros, lo que hace de la genómica una herramienta útil y versátil.

La paradoja del tamaño de los genomas

En sus inicios, los estudios genómicos consideraron diferentes los genomas de eucariotas y procariotas, planteando como hipótesis básica que los primeros, al ser más complejos, serían más grandes, y en contraposición la simplicidad de los procariotas derivaría en genomas más pequeños. Pero a día de hoy los datos genómicos evidencian que existe una enorme variabilidad de tamaño entre genomas eucariotas por un lado, y procariotas por otro. Tanto la diferencia de tamaños, como la correlación entre el tamaño del genoma y la complejidad de un organismo, han sido motivo de un amplio debate durante muchos años (Cavalier-Smith, 1985; Petrov, 2001; Lynch y Conery, 2003), derivando en lo que se conoce como “paradoja del valor C” (Gregory, 2005). Esta cuestión se fundamenta en que al determinar la cantidad de ADN (C) en una especie eucariota se obtiene una cifra mayor a la esperada teniendo en cuenta las proteínas necesarias para las funciones que debe realizar dicho organismo, al igual que organismos, aparentemente más complejos, pueden tener un valor C menor que otros considerados más simples.

En el caso de eucariotas, este amplio rango de tamaños se convirtió en un enigma y un reto en investigación en las últimas décadas (Archibald y Lane, 2009). Por ejemplo, el genoma del organismo unicelular *Amoeba dubia* ha sido estimado en 670.000 millones de pares de bases (Mb), aproximadamente 200 veces mayor que el del genoma humano – 3.200 Mb - y 200.000 veces mayor que el del microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* - 2,9 Mb - (Katinta y col., 2001; Lander y col., 2001; Archibald y Lane, 2009).

En cuanto a procariotas, hasta hace poco se definió un rango de variabilidad menor que en el caso anterior observándose una diversidad entre 0,5 y 10 Mb (Moran, 2002). Pero la información genómica hoy disponible revela igualmente un amplio rango de tamaños reorganizados tanto en moléculas circulares como lineales (Klug, y col., 2006), llegando a referir los más grandes en 30 Mb, como el de *Bacillus megaterium* (Liu y col., 2011), y el más pequeño, de *Candidatus carsonella ruddii*, en 160 kb (Nakabachi y col., 2006).

Y es que en realidad no es la condición de eucariota o procariota, ni el hecho de ser uni o pluricelular lo que marca el tamaño de un genoma. Es más, el que un genoma sea grande no significa que su densidad génica sea mayor que la de un genoma pequeño. La riqueza de genes de un genoma, o densidad génica, guarda relación directa con el estilo de vida del organismo en cuestión. Un organismo que requiera un metabolismo complejo, sin más herramientas genéticas y proteicas que las propias, deberá contar con una amplia batería de genes que soporten y hagan posible dicho metabolismo. Sin embargo, un organismo que goce de la posibilidad de explotar el metabolismo ajeno junto con sus productos, no requerirá de los genes necesarios para ello y, evolutivamente, se podrá “permitir el lujo” de perderlos, condenándose por otro lado a una vida de simbiosis o parasitación obligatoria. En el caso del procariota ya citado *C. carsonella ruddii* hablamos de un endosimbionte con un genoma muy pequeño organizado en un solo cromosoma donde numerosos genes considerados esenciales para la vida están ausentes, lo que sugiere que la especie ha alcanzado un estatus próximo al de orgánulo (Nakabachi y col., 2006) siendo ya imposible llevar una vida libre.

Pero igualmente al observar eucariotas con un estilo de vida parecido, el tamaño de los genomas sigue siendo muy variable. Ha sido la genómica comparativa la que ha dado una buena respuesta a la paradoja del valor C, y es que la variación en tamaño se debe en su mayoría a la cantidad de fragmentos de ADN no codificantes, manteniéndose el número total de genes más estable (Lynch, 2006). Por ejemplo, una gran proporción del genoma de algunas plantas y animales está compuesta por segmentos no codificantes de ADN, como intrones y espaciadores intergénicos, además de los llamados elementos egoístas (Bennetzen 2002; Gregory 2005). Por otro lado, los genomas de eucariotas unicelulares están mucho más compactados lo que significa que la cantidad de elementos repetidos y genes duplicados es muy pequeña, encontrándose, por el contrario, miles de genes empaquetados en un espacio muy pequeño (Archibald y Lane, 2009).

Reducción y compactación de un genoma

Existen dos maneras de reducir un genoma, una consiste en comprimir todos los genes necesarios en un espacio muy reducido y la otra es la pérdida real de material genético tanto codificante como estructural. Ambos procesos se llevan a cabo bajo situaciones muy diferentes, tanto como diferentes son las consecuencias sobre la forma, función y contenido del genoma (Keeling, 2004).

Dentro del primer tipo de compactación encontramos eucariotas de vida libre como el caso del hongo Ascomiceto filamentoso *Ashbya gossypii*, cuyo genoma contiene 9.2 Mb (Dietrich y col., 2004), o como miembros del género de algas verdes *Ostreococcus*, las cuales poseen genomas pequeños que oscilan entre los 12 y 13 Mb (Derelle y col., 2006; Palenik y col., 2007). En estos casos, pese al bajo tamaño del genoma, la densidad génica es muy grande lo que concuerda con su condición de vida libre y con la teoría de la compactación genómica.

Dentro del segundo tipo se encuentran los casos de mayor reducción genómica: los parásitos intracelulares. Estos organismos disfrutan de una ventaja evolutiva importante al utilizar activamente el metabolismo de la célula huésped, lo que implica que una reducción genómica con pérdida de genes sea posible en casos de parásitos eucariotas como el diplomonádido *Giardia lamblia*, que tiene un genoma estimado en 12 Mb (Morrison y col., 2007) o, dentro de Apicomplexa, *Plasmodium falciparum* y *Cryptosporidium parvum*, que tienen genomas de 23 y 9 Mb respectivamente (Gardner y col., 2002; Abrahamsen y col., 2004).

Pero sin duda, los casos más extremos de genomas reducidos en eucariotas se encuentran entre especies de microsporidios. Al igual que en caso anterior, su estilo de vida está basado en la parasitación intracelular obligada, produciendo cambios celulares, metabólicos y genéticos en su hospedador para su propio beneficio (Keeling y Slamovits 2004; Keeling y Slamovits, 2005). Esto les ha permitido prescindir de parte de sus componentes genéticos a lo largo de la evolución. Hasta el año 2010 *Encephalitozoon*

cuniculi contaba con el genoma eucariota más pequeño descrito hasta el momento, 2.9 Mb (Vivares y col., 1996) y fue durante muchos años un organismo modelo de genomas reducidos. Pero en el año 2010 Corradi y colaboradores describieron en *Encephalitozoon intestinalis* un genoma de 2.3 Mb, un 20% más pequeño que en caso anterior, un 50% más pequeño que *E. coli*, un 75% más pequeño que *Saccharomyces cerevisiae* y 1000 veces más pequeño que el genoma humano (Keeling y Slamovits, 2004).

Pero dejando a un lado el por qué unos organismos compactan su genoma, o bien por qué unos lo compactan en mayor medida que otros, los genomas reducidos son a día de hoy una línea de investigación muy interesante. El conocimiento sobre el número de genes mínimo para la vida, o el estudio de la organización y correcto funcionamiento de estos genomas comprimidos, la ganancia necesaria o pérdida aceptable de material genético, y por supuesto, su gran aplicación en la construcción de genomas sintéticos (Klasson y Andersson, 2010) hace de estos organismos un modelo de estudio de gran utilidad.

El genoma de los microsporidios

Los microsporidios son hongos parásitos intracelulares que cuentan a día de hoy con alrededor de 1200 especies descritas (Becnel y Andreadis, 1999; Wittner y Weiss, 1999; Keeling y Fast, 2002; Adl y col., 2012). Actualmente son varios los proyectos genoma que se han llevado a cabo, gracias a los cuales existe una amplia información de organismos como *E. cuniculi* (Katinka y col., 2001), *E. intestinalis* (Corradi y col., 2010), *Nosema bombycis* y *Nosema antheraeae* (Pan y col., 2013), *Nosema apis* (Chen y col., 2013) y *Nosema ceranae* (Cornman y col., 2009). La genómica comparativa juega un papel crucial en este tipo de estudios.

El genoma reducido de estos organismos ha sido objeto de estudio desde las primeras investigaciones genéticas (Biderre y col., 1994, 1995). Sin embargo, aunque la compactación del genoma parece ser una característica significativa de todo el grupo, resulta complicado generalizar sobre el genoma de 1200 especies distintas. Además, los

microsporidios son un grupo no solo amplio, sino también diverso que lleva creando controversia y debate a su alrededor durante muchos años.

A nivel genómico se debería dar por sentado que si todos los microsporidios realizan su ciclo completo de vida en el interior de una célula huésped, sus genomas deberían ser, si no de tamaños similares, sí de una densidad génica parecida. Contrariamente a esto, cada organismo parece haber evolucionado de manera diferente comprimiendo su genoma de forma distinta a lo largo de su historia, lo que da lugar a que se hayan encontrado casos de tamaños entre 15 y 30 Mb entre los genomas más grandes (Biderre y col., 1994; Corradi y col., 2009) e inferiores a 3 Mb entre los más pequeños (Biderre y col., 1994; Peyretailade y col., 1998), siendo además los primeros de una densidad génica baja y habiendo sido descritos en su interior varios elementos transponibles (Williams y col., 2008a; Cornman y col., 2009).

El caso más extremo de compactación genómica se encuentran en organismos del género *Encephalitozoon*, parásitos ampliamente distribuidos en vertebrados incluyendo la especie humana. En este género se encuentra el genoma eucariota más pequeño descrito hasta la fecha, *E. intestinalis* con 2.3 Mb distribuidas en 11 cromosomas (Corradi y col., 2010). A continuación estaría el genoma de *E. cuniculi* con un tamaño de 2.9 Mb (Vivares y col., 1996) y que fue el primero en ser secuenciado (Katinka y col., 2001). Los 11 cromosomas de *E. cuniculi* miden entre 217 y 315 kb. En su interior existen zonas de alta densidad génica flanqueadas por repeticiones subteloméricas de genes ribosómicos (Brugère y col., 2000). Esta organización ha sido también encontrada en otros genomas eucariotas compactados y, dentro de los microsporidios, en *Antonosporea locustae* (Slamovits y col., 2004a). Aunque *E. cuniculi* posee una densidad génica mayor que otros eucariotas, el potencial codificante de este microsporidio es bajo, contando con menos de 2000 genes reconocidos, lo que hace evidente la pérdida de genes en el proceso de reducción genómica. Pero la distribución genética demuestra que tal pérdida no fue aleatoria, ya que los genes anulados representan rutas metabólicas o procesos de regulación completos (Keeling y Slamovits, 2004).

Así pues, los genomas de los microsporidios se reorganizan en múltiples cromosomas lineales al igual que el resto de los eucariotas. Pero, además de ser extremadamente pequeños, estos cromosomas tienen una serie de características especiales como secuencias intergénicas muy cortas, no repetidas, y muy pocas evidencias de elementos transponibles, frente a lo cual doblan aproximadamente la densidad genética de genomas más grandes, como organismos del género *Saccharomyces* (Keeling, 2009).

Otras consecuencias de la reducción genómica son, por ejemplo, el hecho de que los genes de los microsporidios son más cortos que los de sus homólogos en otras especies de hongos (Keeling, 2009), siendo además el número de intrones menor, 14 en todo el genoma de *E. cuniculi* y reducción total en *Enterocytozoon bieneusi* (Akiyoshi y col., 2009).

Igualmente, gran parte de la reducción de un genoma se ve reflejada en los segmentos intergénicos, siendo estos muy cortos o inexistentes, así que ciertos genes de estos organismos se disponen muy próximos y, consecuentemente, se han detectado transcritos solapados en especies como *E. cuniculi* y *A. locustae* (Williams y col., 2005; Corradi y col., 2008). De hecho, el final de la transcripción no suele acabar inmediatamente al finalizar la secuencia del gen, sino que se encuentra más allá de la terminación, o incluso en el gen adyacente, de manera que el ARN mensajero (mRNA) puede contener secuencias de más de un gen aunque sólo uno parece ser traducido a proteína, en algunos casos debido a que los genes adicionales se encuentran en la hebra contraria (Keeling, 2009).

Curiosamente, la longitud de los segmentos intergénicos varía notablemente dependiendo de la orientación transcripcional de los dos genes flanqueantes. Si los dos genes se transcriben de forma divergente el uno del otro, la cantidad de ADN intergénico es un 50% mayor que si la transcripción entre ambos es convergente, mientras que si ambos genes se transcriben en la misma dirección existen segmentos intergénicos de una longitud intermedia (Keeling y Slamovits, 2004).

Sin embargo, los microsporidios no siempre sacrifican su material genético aprovechando que su metabolismo está garantizado por el hospedador, sino que en algunos

casos han sido capaces de apropiarse de ciertos genes del mismo integrándolos en su pequeño genoma, lo que se conoce como transferencia horizontal de genes (HGT) (Selman y Corradi, 2011). Este es el caso de los genes que codifican para proteínas transportadoras de ATP/ADP; los microsporidios tienen una gran riqueza en proteínas transportadoras que les son muy útiles a la hora de “robar” metabolitos y energía al hospedador (Katinka y col., 2001; Tsaousis y col., 2008; Corradi y col., 2009; Selman y Corradi, 2011; Heinz y col., 2012; Nakjang y col., 2013). Pero los genes adquiridos por parte de los microsporidios no son comunes para todas las especies; por ejemplo, se sabe que especies de los géneros *Nosema*, *Octospora* y *Antonospora* han incorporado a sus respectivos genomas genes de sus hospedadores que les confieren mayor protección celular (Fast y col., 2003; Corradi y col., 2009; Xiang y col., 2010) frente a otros que no lo han hecho.

Hay un punto que particularmente ha desconcertado a muchos investigadores: los llamados elementos egoístas. Está demostrado que *E. cuniculi* y *E. bieneusi* carecen de transposones, o al menos de los conocidos hasta ahora (Katinka y col., 2001; Corradi y col., 2007; Akiyoshi y col., 2009; Corradi y col., 2010; Keeling y col., 2010; Pombert y col., 2012), pero la existencia del gen de la transcriptasa inversa en especies como *Vittaforma corneae* y *Spraguea lophii* sugieren la presencia de estos elementos (Hinkle y col., 1997; Mittleider y col., 2002). También se han descrito transposones en genomas “más grandes”, como *Brachiola algerae* y *Edhazardia aedis* (Williams y col., 2008a), al igual que en *A. locustae* (Fast y col., 2003). En el genoma de *N. bombycis* (15,7 Mb) se han descrito secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) propias de elementos transponibles conocidos, como el *gypsy-type retrotransposon* (Xu y col., 2006; Pan y col., 2013) al igual que parece ocurrir en *N. ceranae* (Cornman y col., 2009; Parisot y col., 2014) y en *N. apis* (Chen y col., 2013). Aunque los casos de elementos repetidos transponibles son ampliamente conocidos en eucariotas (Wickstead y col., 2003), su diversidad y actividad en microsporidios abre un camino de investigación muy interesante teniendo en cuenta el paradigma de la selección de rutas de compactación genómica, la gran facilidad por la cual los genes del hospedador sin intrones se pueden transportar por elementos activos, y la oportunidad de ganancia de genes del parásito por HGT (Cornman y col., 2009).

La existencia variable de transposones, la diferencia de tamaños, la pérdida relativamente homóloga de genes pero la ganancia aleatoria de otros, en resumen, las diferencias entre genomas de microsporidios apuntan a procesos evolutivos paralelos, pero no iguales. Y es aquí donde la genómica comparativa se convierte en una herramienta fundamental, ya que la comparación de genomas revela que actualmente existe reducción genómica en algunas especies, pero expansión en otras. Hasta hace poco tiempo parecía estar claro que en ciertas especies como *E. cuniculi* o *E. intestinalis* la reducción genómica era más que evidente, y aunque no todos los genomas de microsporidios tuviesen exactamente las mismas características, todos tienen un genoma pequeño y una alta homología genética, lo que hacía presuponer que todos seguían su propio proceso de compactación. Pero en el año 2013 Pan y colaboradores realizaron un estudio de genómica comparativa de las especies *N. bombycis* y *N. antheraeae* frente al “fuera de grupo” *N. ceranae*, secuenciado anteriormente por Cornman y colaboradores, en el 2009. En este estudio se demostró que, sorprendentemente, el genoma de *N. bombycis* se está expandiendo gracias a la producción de genes duplicados, la proliferación de elementos transponibles derivados del hospedador y la adquisición por HGT de varios genes de bacterias. La duplicación de ciertos genes asociados con rutas de citotoxicidad demostraron una posible selección adaptativa en *N. bombycis* que no solo le confiere mayor patogenicidad sino también más plasticidad a la hora de invadir un nuevo hospedador. Igualmente, en el año 2013, Nakjang y colaboradores construyeron un árbol filogenómico en el cual detectaron un fenómeno de cuello de botella en un ancestro de los microsporidios, a partir del cual cada especie evolucionó de manera independiente. Esto supone que cada genoma fue adquiriendo genes por HGT y perdiendo material genético de manera individual, lo que explicaría los distintos procesos de expansión y reducción genómica.

De esta manera queda abierto un nuevo debate sobre los genomas de los microsporidios. Está claro que a lo largo de su proceso evolutivo ocurrió una compactación y reducción genómica, dejando impresas una serie de características genómicas comunes en todos ellos. Pero determinar si se siguen comprimiendo, si aprovechan un momento de expansión para hacerse más fuertes, o si simplemente se mantienen estables, es una cuestión incierta a día de hoy. Actualmente lo que parece ser seguro es que la manera en la

que evolucionó cada genoma no es tan correlativa entre especies como en un principio parecía.

2. Los microsporidios

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los microsporidios son parásitos unicelulares y eucariotas, que dependen de una célula huésped para desarrollar y completar su ciclo biológico (Wittner y Weiss, 1999). Constituyen un grupo de organismos muy heterogéneo, contando actualmente con 1200 especies descritas, distribuidas en 150 géneros (Keeling y Fast., 2002), pero estos datos están en constante cambio ya que el número de especies detectadas aumenta cada año. A día de hoy, y tras mucha controversia, los microsporidios están clasificados dentro del reino de los hongos (Adl y col., 2005, 2012; Lee y col., 2008) y tienen capacidad para infectar un amplio rango de hospedadores, desde protistas hasta seres humanos, aunque una gran cantidad de especies son parásitos de invertebrados (Becnel y Andreadis, 1999).

El ciclo celular de los microsporidios se desarrolla en su totalidad en el interior de una célula hospedadora, dentro de la cual ocurren conjuntamente una serie de procesos que optimizan el transcurso de parasitación. Así, los microsporidios modifican el ciclo celular de su huésped aprovechándose tanto de su metabolismo como de sus metabolitos, nutrientes y energía (Keeling y Slamovits 2004, 2005) hasta que, con la salida al exterior de las formas parasitarias maduras, la célula huésped muere. Ante este proceso, no es extraño que en ciertas especies, como *Nosema algerae*, se haya detectado una inhibición de la apoptosis de la célula hospedadora forzada por el microsporidio, gracias a lo cual éste puede crecer y optimizar su desarrollo dentro de la misma célula durante varios días (Scalon y col., 1999). Igualmente, especies del género *Encephalitozoon* poseen la capacidad de modular el mediador p-53 de apoptosis en cultivos celulares (del Águila y col., 2006), y en otras especies

como *N. ceranae* se ha descrito inhibición de apoptosis pero por rutas aún desconocidas (Higes y col., 2013a). Esta característica confiere una ventaja muy grande para estos parásitos, y aunque los mecanismos de cada especie para ello son diferentes y en muchos casos desconocidos, no sería una sorpresa el que esta característica fuera común para todo el grupo (Higes y col., 2013a).

Características celulares

Los Microsporidios se han considerado durante muchos años como organismos “primitivos” por poseer una serie de características celulares muy singulares, por ejemplo, carecen de mitocondrias al igual que de otros orgánulos celulares como peroxisomas y centriolos, y del clásico aparato de Golgi laminado, siendo el suyo vesicular (Vávra, 1965). El hecho de carecer de mitocondrias provocó grandes dudas sobre su posición entre los eucariotas, hasta que en el año 2002 Williams y colaboradores describieron en *Trachipleistophora hominis* la existencia de mitosomas, definidos como pequeños orgánulos “derivados mitocondriales reducidos”. Esto demostró no solo su naturaleza eucariótica sino que desvinculó a los microsporidios del falso concepto inicial de “primitivo”. Este hecho también apoyó la hipótesis de la existencia de un ancestro común en microsporidios cuyas mitocondrias “involucionaron” a mitosomas.

Los mitosomas están formados por una doble membrana y, aunque carecen de las características propias de las mitocondrias, ciertos genes se hayan localizados en ellos (Williams y col., 2002, 2008b; Goldberg y col., 2008). Al no existir mitocondrias, los productos de estos genes se han reutilizado para llevar a cabo funciones citosólicas, obviamente diferentes a las originales (Keeling, 2009). Los mitosomas parecen ser incapaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa pero sí hay evidencias de que juegan un papel importante en la bioquímica del hierro-sulfuro (Vivares y col., 2002; Burri y col., 2006). Igualmente, los microsporidios necesitan energía que los mitosomas no les proporcionan, de manera que una vez dentro de su célula huésped, inducen la agrupación de las mitocondrias

de la misma a su alrededor con el fin de garantizar ATP suficiente para llevar a cabo su ciclo biológico (Higes y col., 2007; Keeling, 2009).

El número de núcleos de los microsporidios varía entre uno o dos dependiendo de las especies. La diplocariogamia consiste en dos núcleos estrechamente unidos en lo que se llama “conformación en grano de café”, que supuestamente son iguales y se dividen al mismo tiempo (Vávra, 1976). En un principio, estos núcleos se supusieron haploides siguiendo con la dinámica de la reducción genómica. Sin embargo, en el año 2000 Brugère y colaboradores, describieron el único núcleo de *E. cuniculi* como diploide, de manera que no se puede especular con la haploidía o diploidía de cada especie (Cuomo y col., 2013). En cualquier caso, como ya se ha comentado en el apartado anterior, los genomas de los microsporidios son muy reducidos dada su condición de parásitos intracelulares obligados (Biderre y col., 1995; Keeling y Fast., 2002).

En cuanto a la división celular, los microsporidios utilizan la pleuromitosis intranuclear cerrada, lo que significa que tanto mitosis como meiosis se producen sin la disolución de la membrana nuclear y que el huso mitótico se encuentra exclusivamente dentro del núcleo (Hollande, 1972; Raikov, 1982), hecho que explica la carencia de centriolos. Existe desincronización entre cariocinesis y citocinesis lo cual provoca que las formas intermedias del ciclo celular puedan albergar varios núcleos o varias parejas de ellos antes de comenzar con la división citoplasmática.

Por otro lado, los microsporidios son organismos que cuentan con una fase esporulada dentro de su ciclo biológico. Esta fase les permite sobrevivir fuera de la célula huésped al igual que es necesaria para iniciar un proceso infeccioso (ver apartado ‘ciclo biológico’). En el momento de la infección, la inyección del contenido celular desde la espora al interior de la célula huésped se realiza a través de una estructura llamada filamento polar. Este orgánulo constituye la estructura funcional más significativa de este grupo de organismos.

La espora que forman los microsporidios se definió inicialmente como una estructura refractaria vista al microscopio óptico, y su forma y tamaño hacían difícilmente reconocibles las distintas especies. Pero la llegada de la microscopía electrónica permitió observar con precisión su interior (Franzen, 2008). Los orgánulos celulares se encuentran comprimidos junto con el núcleo (o los núcleos en caso de especies binucleadas) mientras que el filamento polar se dispone enrollado a su alrededor (Wittner y Weiss, 1999) (Figura 1).

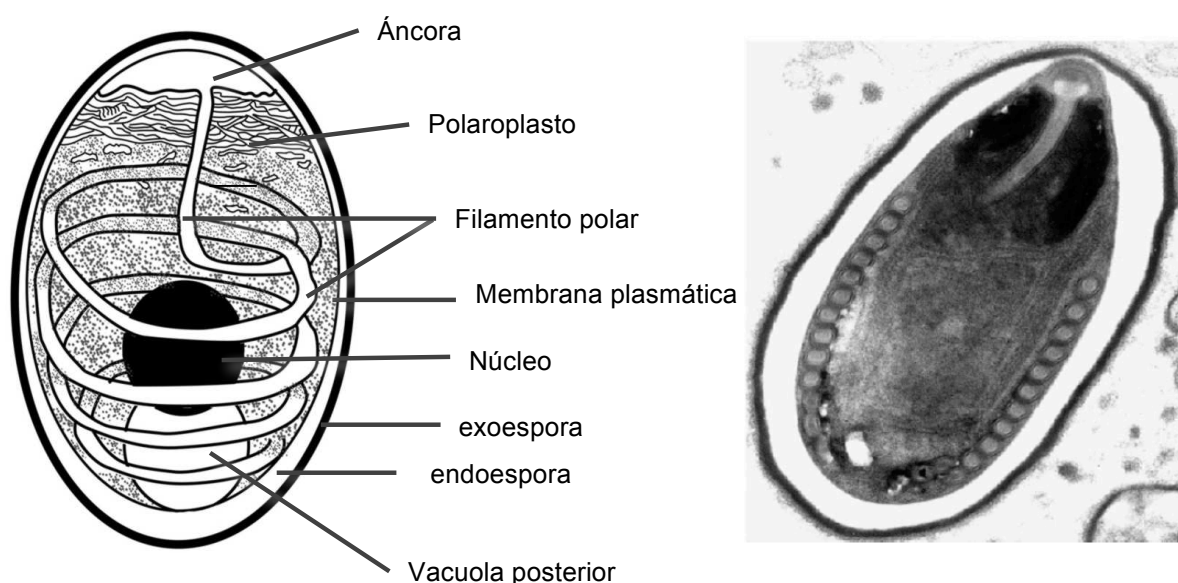


Figura 1. Estructura general de un microsporidio mononucleado en su forma esporulada. A la izquierda, un esquema de cómo se distribuye el filamento polar enrollado alrededor de los orgánulos. Están indicados, por orden, el disco de anclaje, o áncora, y el polaroplasto, el filamento polar enrollado alrededor del núcleo, la membrana plasmática, exoespora y endoespora y, finalmente, la vacuola responsable de la extrusión del contenido celular a través del filamento polar. A la derecha, la imagen obtenida por microscopía electrónica de un corte longitudinal de una espora. En él se aprecian claramente las vueltas del filamento polar y el disco de anclaje.

A la hora de clasificar una especie de microsporidio, la espora madura es sin duda la forma más característica (Franzen, 2008). En primer lugar, su estructura y distribución celular hace de los microsporidios organismos muy reconocibles frente a otros grupos de parásitos esporulados. Y en segundo lugar, la longitud del filamento polar varía de unas especies a otras, lo que provoca que el número de vueltas alrededor del contenido celular sea diferente en cada especie. Así pues, con la microscopía electrónica las variables “tamaño y forma de espora”, “características de la endo y exoespora”, “número de núcleos” y

“número de vueltas del filamento polar” se convirtieron en las bases para distinguir y clasificar las distintas especies de microsporidios, hasta que con la aparición de las herramientas genéticas el sistema de clasificación comenzó a cambiar (Weiss y Vossbrinck, 1998). En 1987 Vossbrinck y colaboradores usaron métodos de secuenciación molecular basados en los genes ribosómicos para clasificar filogenéticamente a *Vairimorpha necatrix* en el árbol de la vida, y demostraron que los microsporidios forman parte de un linaje evolutivo muy antiguo.

Ribosomas y genes ribosómicos

Otra característica que convierte los microsporidios en organismos “atípicos” es que, siendo eucariotas, poseen ribosomas propiamente procariotas (Curgly y col. 1980). En 1968, Ishihara y Hayashi demostraron por la técnica de centrifugación que ambas subunidades de los ribosomas de *N. bombycis* tienen los mismos coeficientes de densidad que *E. coli*, al igual que un 60% de similitud en el contenido de ARN de los ribosomas. Este hecho no fue investigado de nuevo hasta que, en 1986, Vossbrinck y Woese utilizaron herramientas genéticas para demostrar la carencia de la subunidad 5.8S, supuestamente universal, en el microsporidio *Vairimorpha necatrix*. Pero los microsporidios son eucariotas y sus ribosomas también lo son con la peculiaridad de que, al estar su genoma compactado, sus secuencias ribosómicas son más cortas de lo habitual, al igual que ocurre con otros genes (Keeling, 2009). Las densidades reales de las subunidades ribosómicas son 16S, 18S y 5S (Ironsides, 2007, 2013).

El rDNA alberga los genes de las tres subunidades ribosómicas: la subunidad pequeña (SSU), la subunidad grande (LSU), y finalmente la subunidad 5S, separadas en el genoma bien por un espaciador intergénico (IGS), más largo, o bien por lo que se conoce como “segmento transcrito interno” (ITS), más reducido. Este último es un espaciador que se encuentra normalmente entre la SSU y LSU, se transcribe junto con ellas y libera las dos subunidades en el momento en el que es eliminado en la maduración de rRNA. El ITS suele ser de pocas decenas de bases y alberga polimorfismos suficientes para distinguir tanto organismos

distintos, como cepas dentro de una misma especie, por lo que ha sido ampliamente utilizado en filogenias de microsporidios (Huang y col., 2008; Santin y Fayer, 2009; Sak y col., 2011; Wilkinson y col., 2011; Li y col., 2012). En el año 2012 fue catalogado como un “código de barras” universal para hongos por Schoch y colaboradores.

Además del ITS, las tres subunidades de los genes ribosómicos han sido los marcadores genéticos más utilizados para clasificación molecular de los microsporidios. Estos genes están repetidos a lo largo de un genoma y su distribución varía en función de cada especie, por ejemplo en *E. cuniculi* estas copias se encuentran dispersas en los telómeros (Katinka y col., 2001), en *N.bombycis* las copias se encuentran dispersas por los múltiples cromosomas (Liu y col., 2008) y en *N. apis* y *N. bombi* las copias se disponen en tándem (Gatehouse y Malone, 1998; O’Mahony y col., 2007).

Hasta hace poco se suponía que todas las copias compartían si no una secuencia exactamente igual, sí una alta uniformidad entre ellas dentro de la misma especie (Nei y Rooney, 2005; Ueno y col., 2007). Es por esto que el rDNA es un marcador molecular de primera elección a la hora de detectar un organismo en una muestra, o para diferenciar genéticamente unas especies de otras. Pero existen casos en los que las copias de rDNA no son iguales dentro de una misma especie, como son *N. apis*, *N. bombi*, *N. bombycis*, *N. granulosis* y *N. ceranae* (Gatehouse y Malone, 1998; O’Mahony y col., 2007; Liyama y col., 2004; Sagastume y col., 2011; Chen y col., 2013; Krebs y col., 2014). Las unidades de rDNA dispuestas en tándem tienden a albergar menor variabilidad que las dispersas dado que son más susceptibles de homogenización por sobrecruzamientos desiguales o conversión génica, generando lo que se conoce como evolución concertada (Dover y Coen, 1981). En el caso de las copias dispersas, la evolución concertada parece actuar en menor grado ya que los procesos implicados son más comunes entre cromosomas homólogos que entre heterólogos (Goldman y Lichten, 1996), lo que hace pensar que otros procesos, como el de “nacimiento y muerte” de genes, deberían actuar en pos de la homogeneización de esas copias. Este último proceso consiste en el “nacimiento” de genes por duplicación de los existentes y la posterior “muerte” por delección (Nei y Rooney, 2005). Sin embargo, los casos citados anteriormente corresponden a especies con copias diferentes organizadas tanto en tándem

como dispersas, y la variabilidad nucleotídica del rDNA dentro de una misma especie da a entender que ni la evolución concertada ni los demás mecanismos de homogenización genética están actuando, hecho que actualmente sigue rodeado de controversia sin una respuesta clara.

Ciclo biológico

Existen varios modelos de ciclo biológico a los que se han ido ajustando los géneros descritos a lo largo de los años. A grandes rasgos, el ciclo celular se compone de tres fases: fase infectiva, fase proliferativa y fase esporogónica (Wittner y Weiss, 1999) (fig. 2).

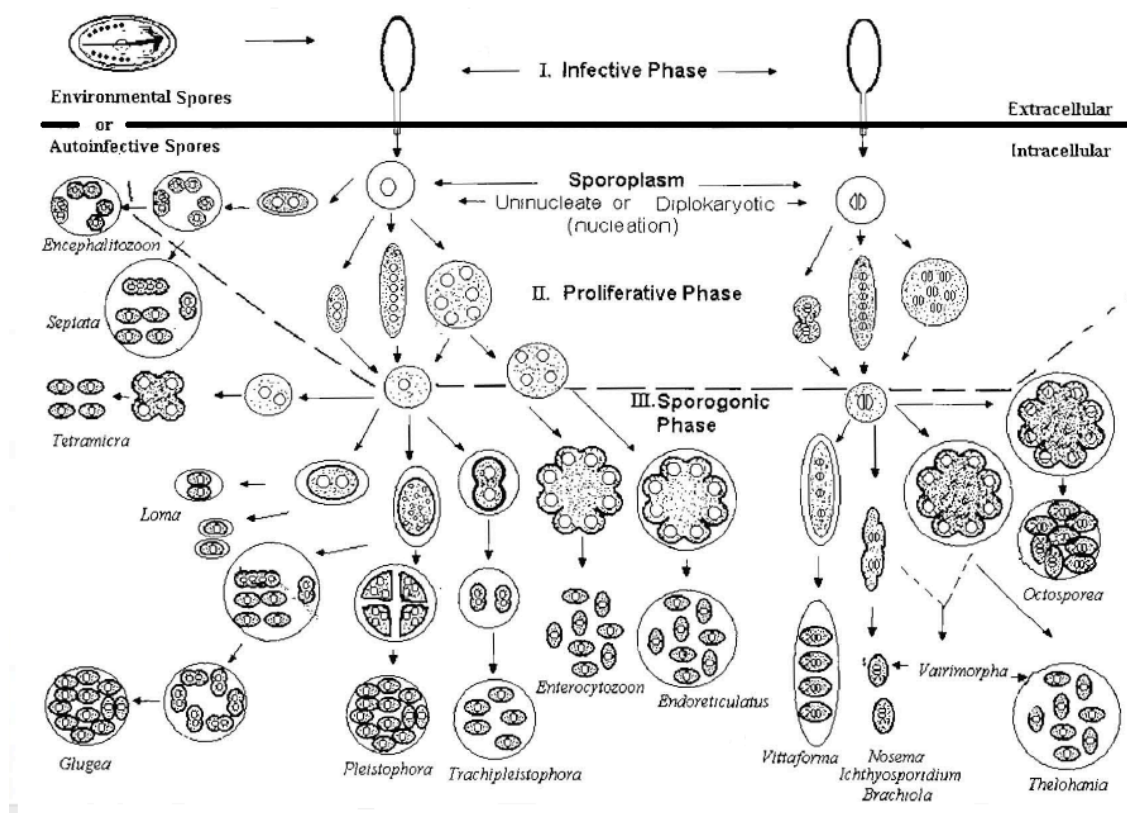


Figura 2. Esquema del ciclo de vida de los microsporidios extraído del libro de Wittner M. y Weiss L.M. (1999) "The Microsporidia and Microsporidiosis", ASM Press (capítulo 3 "Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia", escrito por Ann Cali y Peter M. Takvorian, p 85-128, Figura 8), y del libro del año 2014 "Microsporidia: Pathogens of Opportunity", Louis M. Weiss y James J. Becnel (Eds), Wiley Blackwell Press (capítulo 2 "Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia", escrito por Ann Cali y Peter M Takvorian, p 71-133; Figure 2.13). La figura se ha utilizado con permiso del Doctor Louis M. Weiss.

La primera asegura la transmisión del patógeno y consiste en la inyección del contenido de la espora (esporoplasma) dentro de la célula huésped a través del filamento polar. Hay varios estudios realizados sobre este proceso pero, a día de hoy, el mecanismo concreto para ello es aún incierto (Franzen, 2008; Williams, 2009). Una vez en el interior de la célula hospedadora, el esporoplasma toma la forma de meronte y entra en la segunda fase, la fase proliferativa (Wittner y Weiss, 1999). Los merontes utilizan tanto los orgánulos de la célula huésped como sus nutrientes para llevar a cabo el desarrollo celular (Canning, 1997). Una vez finalizada esta fase, los merontes cambian su morfología para dar paso a los esporontes y entrar en la tercera y última fase, la fase esporogónica. En esta fase se suceden una serie de divisiones celulares hasta que, en la última, se forma el esporoblasto, o espora inmadura (Wittner y Weiss, 1999). La fase concluye con la formación de las esporas maduras que saldrán al exterior para comenzar una nueva infección (Szumowski y col., 2012), o germinarán dentro de la célula en la que se encuentran para llevar a cabo un segundo ciclo en su interior (Higes y col., 2007).

La extensión e importancia de las dos últimas fases del ciclo varía de unas especies a otras, por ejemplo, el género *Nosema* es el que posee la fase esporogónica más reducida en la que por cada esporonte individual se obtienen únicamente dos esporas (Brooks, 1985), en contraposición con la esporulación múltiple de las demás especies (fig. 2). Esto fuerza que la fase proliferativa se repita varias veces con el fin de garantizar mayor eficacia del proceso infectivo (Wittner y Weiss, 1999).

Reproducción Sexual en Microsporidios

La presencia o ausencia de un proceso sexual en microsporidios es crucial a la hora de interpretar resultados de secuencias de ADN, tanto en estudios genéticos como genómicos. Durante muchos años y hasta la fecha, no estuvo demasiado clara la cuestión de la existencia de meiosis en microsporidios, y aunque se estableció como primera hipótesis un modelo de reproducción asexual que parecía existir desde un momento evolutivo muy temprano, las técnicas de microscopía descubrieron en los ciclos biológicos de ciertas

especies la alternancia entre fases mono y diplocariotas, lo que ya hizo sospechar de la presencia de ciclo sexual (Dunn y Smith, 2001). En 1976 y 1979, dos trabajos (Loubès y col., y Loubès, respectivamente) describieron reproducción sexual en microsporidios pero tras un largo periodo de debate este suceso seguía siendo catalogado como minoritario y aislado (Hurst, 1993; Flegel y Pasharawipas, 1995). Aunque la meiosis es un proceso predominante entre eucariotas (Malik y col., 2008), la valoración positiva entre las ventajas y el coste que supone una reproducción sexual es, aún a día de hoy, motivo de debate (Ayala, 1998; Ackerman y col., 2010; Archetti, 2010).

Realmente, la primera evidencia científica de un proceso sexual en estos organismos fue en el año 1984 cuando Hazard y Brookbank observaron al microscopio óptico y electrónico cariogamia y meiosis en la transición de merontes a esporontes de un parásito binucleado del género *Amblyospora*. Hazard y Brookbank postularon en varios trabajos posteriores la existencia de un tipo de célula morfológicamente diferente que, siendo mononucleada, actúa como un gameto cuya única función es la de fusionarse con otro por plasmogamia (unión de las membranas y no de los núcleos), de manera que el meronte resultante posee dos núcleos de procedencias distintas (Hazard y col., 1985; Becnel 1992, 1994; Becnel y col., 1987).

Siguiendo la línea de evidencias basadas en microscopía, los complejos sinaptonémicos abrieron una nueva línea de investigación. Este complejo proteico está directamente relacionado con el alineamiento de cromosomas y su recombinación antes, y durante la paquitena (Gladstone y col., 2009). Esta estructura ha sido detectada en varios géneros de microsporidios como *Gurleya*, *Theolaria*, *Pleistophora*, *Tuzetia*, *Baculea*, *Glugea* y *Paranosema* (Loubès, 1979; Nasonova y Smirnov, 2005).

Con la llegada de los estudios genéticos y genómicos se esclarecieron muchas dudas sobre este tema. Durante años se pensó que la asexualidad daba lugar a linajes débiles abocados a la extinción por acumulación de mutaciones, pero hay especies con una asexualidad muy antigua cuyos miembros son fácilmente reconocibles en un árbol filogenético ya que forman grupos separados con grandes distancias evolutivas (Ayala, 1998;

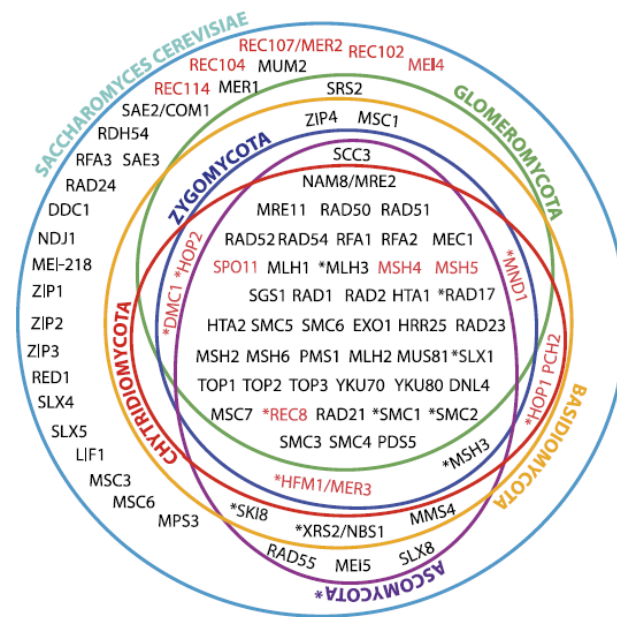
Halary y col., 2011). Basándose en esta última característica es por lo que se siguió postulando un modelo de reproducción asexual en microsporidios. Pero la aproximación genética y genómica reveló que la mayoría de estos supuestos organismos asexuales podrían sufrir procesos de recombinación derivados de reproducción sexual (Schurko y col., 2009; Heitman, 2010) al igual que, en ciertos organismos supuestamente asexuales, entre los que se encuentran varias especies de microsporidios, se han encontrado una serie de homólogos de genes de meiosis. Éstos genes codifican para proteínas cuya función está estrictamente asociada a meiosis o a procesos de reparación de ADN que completan la recombinación meiótica en organismos modelo (Villeneuve y Hillers, 2001; Wong y col., 2003; Ramesh y col., 2005; Lee y col., 2008, 2010; Malik y col., 2008).

Pero desde su detección, los genes de meiosis han sido malconsiderados como marcadores de reproducción sexual en microsporidios, asumiendo que el hecho de poseerlos o carecer de ellos evidenciaba un proceso reproductivo sexual o asexual, respectivamente. Por ejemplo, una de las bases más relevantes para mantener el debate inicial sobre la asexualidad de los microsporidios fue la carencia del gen *DMC1* en ciertas especies como *Nosema*, *Encephalitozoon* y *Spraguea* (Logsdon y col., 1997). El gen *DMC1*, homólogo de Rad51p y RecA en bacterias, codifica para una proteína específica de meiosis relacionada con la reparación de roturas en el ADN y el apareamiento entre cromosomas homólogos. Pero en el proceso de meiosis en hongos hay caracterizados decenas de genes diferentes (fig. 3) y la carencia de uno o varios no es un resultado tan significativo como en un principio se pudo esperar.

La teoría que identificaba carencia de genes de meiosis con asexualidad, y viceversa, dio lugar a muchas incongruencias, porque los genes relacionados con meiosis pueden existir sin la necesidad de un proceso sexual, siendo sus productos reutilizados para una nueva función más o menos alternativa, como el caso de proteínas meióticas dedicadas a la reparación de ADN. Lo que sí parecía ser más plausible era que la carencia de ciertos genes cruciales para poder llevar a cabo una meiosis en hongos (fig. 3, genes en rojo) podría traducirse en una asexualidad forzosa, como es el caso del gen *SPO11* (Merino y col., 2000). Pero igualmente, esta teoría obvia la capacidad de los microsporidios de explotar los

recursos de la célula huésped (Canning, 1998; Keeling y Slamovits 2004, 2005), sobre-expresar o inhibir ciertos genes a su conveniencia (Chaimanee y col., 2012; Higes y col., 2013a) y, por qué no, utilizar proteínas del hospedador para realizar su proceso reproductivo.

Figura 3. Catálogo expandido de genes de meiosis en hongos (Halary y col., 2011) utilizado con permiso del Doctor Nicolas Corradi, autor del trabajo original. El texto en rojo representa los genes específicos de meiosis. Los asteriscos señalan los genes que en ocasiones están ausentes en otros hongos.



En el año 2011, Halary y colaboradores postularon una nueva hipótesis en el estudio de la correlación de estos genes con un proceso sexual en hongos. Estos autores observaron recombinación genética en organismos supuestamente asexuales, pero que, curiosamente, poseían ciertos genes importantes para llevar a cabo una meiosis. Aunque no se descartó la idea de procesos parasexuales o recombinaciones mitóticas, la presencia de estos genes junto con la recombinación genética suponía una evidencia de peso a la hora de suponer un ciclo sexual oculto.

Así pues este debate, al igual que otros tantos alrededor de los microsporidios, sigue abierto actualmente; cada vez más estudios apoyan la existencia de un ciclo sexual en especies que parecían mantener una asexualidad muy clara, al igual que en muchos otros casos la posibilidad de la existencia de un ancestro sexual no muy lejano en el tiempo se ha convertido en una hipótesis muy sólida frente a la de la asexualidad ancestral (Sprague y col.,

1992; Nassonova y col., 2005; Ironside, 2007; Lee y col., 2008; Dyer, 2008; Malik y col., 2008; Lee y col., 2009, 2010; Sagastume y col., 2011; Krebs y col., 2014).

Taxonomía

Desde el comienzo del estudio de los microsporidios hace 150 años, la identificación y designación taxonómica de estos organismos ha sido una tarea tan difícil como controvertida. Los microsporidios fueron descubiertos en 1857 y considerados inicialmente como hongos esquizomicetos (schizomycetes), pero este grupo resultó ser artificial y estar formado por varias levaduras y bacterias (Wittner y Weiss, 1999). Tras años de reorganizaciones poco seguras, Balbiani propuso en el año 1882 por primera vez el taxón independiente Microsporidia para clasificar al único microsporidio conocido hasta el momento, *N. bombycis*, parásito del gusano de seda, *Bombyx mori*.

Los microsporidios fueron durante años clasificados en función de su morfología y ciclo biológico, formando parte de distintos grupos taxonómicos como protozoos (Sprague, 1977) o arqueas (Haeckel, 1894, trabajo recuperado por Cavalier-Smith en 1983), eucariotas los primeros, procariotas los segundos. Y es que en aquel momento la gran pregunta que se planteaba era a qué reino pertenecían estos organismos. Precisamente el hecho de carecer de mitocondrias es lo que convenció a muchos científicos de la hipótesis de la clasificación de los microsporidios dentro de las Arqueas. Las Arqueas son procariotas, carecen de mitocondrias, y evolutivamente se separaron de los eucariotas antes de que éstos adquirieran sus características celulares. De manera que para muchos parecía más probable la hipótesis de que los microsporidios hubiesen carecido de mitocondrias desde sus inicios, y no el poseer mitocondrias inicialmente y perderlas en algún punto de su evolución (Keeling, 2009).

Con la controversia servida, Sprague en 1977 creó el phylum Microspora que posteriormente fue modificado y revisado por muchos autores. La gran evidencia del origen eucariota de los microsporidios llegó en el 2002 con la descripción de mitosomas en

Trachipleistophora hominis (Williams y col., 2002). En el año 2005, Adl y colaboradores los reagruparon en el reino de los hongos, como ya había sugerido Müller en el año 1997. Actualmente se han relacionado estrechamente con el grupo Cryptomycota (James y col., 2013) y se clasifican en Opisthokonta, Fungi, Microsporidia (Adl y col., 2012; Capella-Gutiérrez y col., 2012).

Vías de transmisión

La transmisión de estos organismos varía en función de cada especie y sus hospedadores, pudiendo ser vertical, horizontal, o en algunos casos una mezcla ambas (Dunn y Smith, 2001). La transmisión horizontal es la más común en microsporidios y la más nociva para el hospedador. Consiste en la infección de cada organismo huésped individualmente sin verse su descendencia comprometida. El alto grado de virulencia en este tipo de infecciones se debe a la rapidez del proceso infectivo y a la eficacia del modelo reproductivo de los microsporidios. Así pues, la colonización del hospedador se realiza de forma muy rápida garantizando una gran eficacia de la parasitación, pero un daño irreparable para el hospedador que muere en un plazo de tiempo corto (Dunn y Smith, 2001). Dentro de este grupo encontramos una gran cantidad de especies que infectan invertebrados, como *N. apis* (de Graaf y col., 1994), *N. ceranae* (Higes y col., 2009a) y *N. bombi* (Rutrecht y col., 2007).

Por el contrario, la transmisión vertical produce infecciones más leves (Smith y Dunn, 1991; Ebert y Herre, 1996; Dunn y col., 2000) ya que el parásito se transmite vía transovárica a través de linajes completos (Dunn y Smith, 2001) y una muerte prematura del hospedador supondría comprometer la supervivencia del parásito, de manera que el éxito del proceso infectivo se basa en la cronificación de la enfermedad produciendo un daño moderado al hospedador. Esta clase de transmisión se ha descrito en pocos casos en invertebrados, como *N. granulosis* (Terry y col., 1998), siendo más común entre especies que infectan vertebrados como las del género *Encephalitozoon* (Innes y col., 1962; Hunt y col., 1972).

3. El género *Nosema*

El género *Nosema* contiene alrededor de 100 especies descritas que se encuentran parasitando artrópodos, incluyendo insectos, arácnidos y crustáceos (Ironsides, 2007). *Nosema* es binucleada y parece mantener esta característica durante todo su ciclo, aunque en algunos casos, como *N. bombycis*, se han descrito fases mononucleadas (Sprague y col., 1992) con la formación de una vesícula esporogónica de núcleos individuales, normalmente en grupos de ocho (Pilley, 1986; Canning y col., 1999). Esta característica es típica del ciclo de *Vairimorpha* y no de *Nosema*, pero curiosamente estos dos géneros, pese a sus notables diferencias morfológicas y biológicas, están íntimamente relacionados y puede ocurrir que ciertas especies de *Nosema*, sorprendentemente, desarrollen un ciclo biológico propio de *Vairimorpha* (Baker y col., 1994).

Dentro de *Nosema* encontramos especies de transmisión horizontal, y por tanto con mayor grado de patogenia, como *N. apis* (de Graaf y col., 1994), *N. ceranae* (Higes y col., 2009a) y *N. bombi* (Rutrecht y col., 2007), y otras de transmisión vertical como *N. granulosis* (Terry y col., 1998). La importancia de conocer el tipo de transmisión de una especie no solo radica en prever la futura gravedad de la infección, sino que a la hora de realizar estudios genéticos se presupondrá mayor variabilidad en poblaciones de esporas resultantes de una transmisión horizontal que en las de una vertical. En el segundo caso, la infección en un hospedador individual se alargará en el tiempo y la población de descendientes que se produce está sujeta a sufrir un cuello de botella en cada generación de hospedadores (Weedall y col., 2006; Dunn y col., 1998).

Por otro lado, las interacciones fisiológicas entre las distintas especies de *Nosema* y sus hospedadores son complejas, y la especificidad de una especie por un hospedador determinado indica un alto grado de coevolución entre ellos (Ironsides, 2007).

Filogenias moleculares en *Nosema*: controversia con *Vairimorpha*

A la hora de clasificar especies de *Nosema* la controversia aumenta. El género *Nosema* se constituye como polifilético en cuanto a filogenias basadas en marcadores moleculares (Baker y col., 1994). En los tiempos en los que la clasificación taxonómica se basaba en las características morfológicas no parecía haber dudas sobre la diferencia entre especies de géneros como *Vairimorpha* y *Nosema* (Pilleary, 1976), cuyos ciclos biológicos son fácilmente distinguibles siendo la complejidad de *Vairimorpha* más que evidente frente a la de *Nosema*. Con la introducción de las herramientas moleculares la clasificación comenzó a tambalearse, y especies clasificadas inicialmente en ambos géneros se vieron reagrupadas en otros, o en una posición taxonómica muy dudosa.

Las filogenias moleculares de especies del género *Nosema* se han construido, en su mayoría, apoyándose en el estudio de los genes ribosómicos. Entre estas especies la variabilidad del rDNA es alta, siendo de gran utilidad tanto las secuenciaciones de la SSU como del ITS para estudios de diagnóstico y diversidad interespecíficos. Curiosamente la organización de las subunidades ribosómicas varía de unas *Nosemas* a otras, siendo 5'-SSU-ITS-LSU-3' en *N. bombi* y *N. apis*, y 5'-LSU-ITS-SSU-3' en *N. bombycis*, *N. spodopterae*, *N. plutellae* y *N. antheraeae* (Huang y col., 2004; Ironside, 2007) (fig. 4).

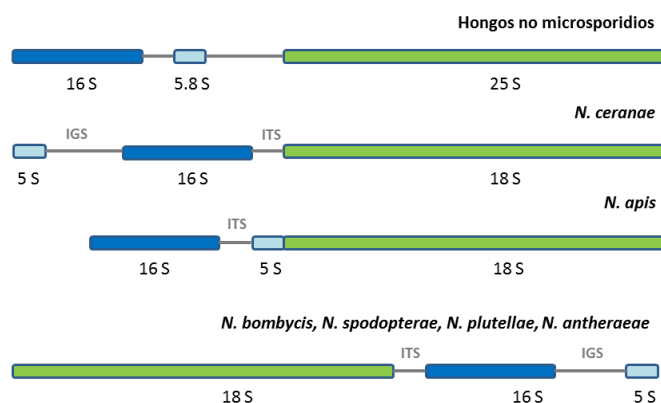


Figura 4. Esquema de la distribución las subunidades ribosómicas en una copia de rDNA a través del género *Nosema*. 16S corresponde a la subunidad pequeña (SSU) y 18S corresponde a la subunidad grande (LSU). Los espaciadores son dos, el segmento transcrito interno (ITS) y el espaciador intergénico (IGS).

Figura basada en la figura 3 del trabajo de Ironside (2007).

El hecho de que ocurra esto dentro de especies del mismo género sugiere que en el proceso de nacimiento-muerte genético se produjo una mutación en una copia de rDNA que dio lugar a un cambio en la organización de las subunidades que la componían y que, por duplicaciones posteriores, se dispersó por el genoma junto con la delección de las copias iniciales (Ironsides, 2007).

Tanto la secuenciación directa del rDNA como la organización 5'-3' de las subunidades han sido utilizadas como herramientas filogenéticas para distinguir y clasificar especies de *Nosema* durante los últimos años (Chen y col., 2009a; Choi y col., 2011; Michalczyk y col., 2013), y precisamente fue con las primeras filogenias basadas en la SSU cuando comenzó la controversia alrededor de los géneros *Nosema* y *Vairimorpha*. Ya en los primeros árboles generales donde estas especies fueron incluidas aparecían especies de ambos géneros compartiendo un mismo clado, claramente separado del resto (Fries y col., 1999; Canning y col., 2002; Refardt y col., 2002). Así, la clasificación de ciertas especies dentro del género *Nosema* comenzó a tambalearse (Slamovits y col., 2004a) y nuevas especies como *Antonosporea locustae*, *Paranosema grylli* o *Brachiola algerae* fueron emergiendo desde *Nosema* a nuevos géneros. De la misma manera, otras *Nosemas* se vieron muy comprometidas en su clasificación ya que su gran similitud con *Vairimorpha* hacía imposible separarlas en clados diferentes (Tsai y col., 2003; Ku y col., 2007). Esto reforzó antiguas hipótesis, como la propuesta por Baker y colaboradores en el año 1994, que propusieron reagrupar a *V. necatrix* en el género *Nosema*.

En el año 2003, Tsai y colaboradores construyeron un árbol filogenético basado en secuencias de la SSUrDNA con especies de los géneros *Endoreticulatus*, *Pleistophora*, *Nosema* y *Vairimorpha*, obteniendo una rama claramente separada con los dos primeros, y una distribución de las dos segundas entremezcladas entre sí formando distintos clados. Por ejemplo, es bastante común en este tipo de filogenias encontrar sistemáticamente clados compartidos por *N. necatrix* y *V. necatrix*, o *N. Portugal* y *V. limantiriae* (Chen y col., 2009a; Chen y Huang, 2010; Dong y col., 2010). En cualquier caso, la homología con un árbol basado en características morfológicas o ciclo de vida es muy baja, dadas las grandes diferencias entre los dos géneros a estos niveles.

A las especies de *Nosema* dispersas filogenéticamente entre *Vairimorpha* se les denominó “Nosemas dudosas” frente a aquellas cuyo ciclo biológico, características morfológicas y filogenia molecular las hacen converger en un mismo clado (las “Nosemas reales”) (Chen y col., 2009a; Choi y col., 2011). De hecho, parece ser que las especies de *Nosema* que muestran una orientación invertida de las subunidades ribosómicas, esto es 5'-**LSU**-ITS-SSU-3', son las que forman el grupo de “Nosemas reales” (Huang y col., 2004; Refardt y Mouton, 2007; Kyei-Poku y col., 2008). En el año 2009 (a), Chen y colaboradores construyeron un árbol filogenético basado en la SSUrRNA con especies de *Nosema* “reales” y “dudosas”, dejando una evidencia más de la gran distancia que existe entre ciertas especies de *Nosema* a las que se suponía íntimamente relacionadas por sus ciclos biológicos y hospedador, y cuyo comportamiento infectivo era muy diferente, como es el caso de *N. apis* y *N. ceranae* (véase, más abajo, el apartado de ‘Problemática en la apicultura’).

Ante este panorama, resulta complicado elegir qué árboles son más fiables, si los clásicos basados en características ultraestructurales, o los más modernos basados en filogenias moleculares. La realidad es que ambos tienen sus desventajas, el primero por ser demasiado amplio, utilizar bases generalizadas y obviar las características genéticas de los organismos estudiados, y los segundos porque son fácilmente mal utilizados. Las filogenias basadas en un solo marcador genético, particularmente en la SSUrDNA, se han utilizado durante los últimos años en microsporidios presuponiendo sus resultados si no absolutos, sí muy representativos. En el año 2007, Ironside construyó tres árboles filogenéticos con las mismas muestras basándose en tres marcadores moleculares diferentes, obteniendo por cada uno un árbol distinto. Él catalogó este hecho como “resultados incongruentes” y advirtió del riesgo que conlleva apoyar hipótesis en filogenias de un solo marcador.

Por otro lado, todo apunta a que las copias de los genes ribosómicos en *Nosema* no son uniformes dentro de la misma especie (Gatehouse y Malone, 1998; Liyama y col., 2004; O'Mahony y col., 2007; Sagastume y col., 2011; Chen y col., 2013; Krebs y col., 2014), existiendo a día de hoy numerosos estudios basados en secuencias clonadas de una misma muestra que evidencian a lo largo de especies de este género variabilidad intraespecífica, indiferentemente de la orientación interna de las subunidades ribosómicas, o de que las

copias de rDNA estén dispuestas en tándem o dispersas. Como se detalla en esta memoria, todo esto ha hecho proponer que el rDNA, aun siendo muy útil a la hora de diferenciar o diagnosticar especies en un hospedador, no es un marcador genético fiable a la hora de construir filogenias ya que no se puede obviar la diversidad subyacente dentro de cada especie (Sagastume y col., 2011). Mientras tanto, otros autores afirman que la variabilidad de este marcador puede ser muy útil a la hora de diferenciar cepas dentro de una misma especie, como ocurre en *N. bombycis* (Liu y col., 2013).

Meiosis en Nosema

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los estudios genéticos acercan especies de los géneros *Nosema* y *Vairimorpha*; en cuanto al segundo, la mayoría de las especies poseen un ciclo sexual completo alternando estados mono y diplocariotas, con la excepción de *V. imperfecta* cuya meiosis desemboca en esporontes monocariotas abortivos, indicando que su fase sexual está desapareciendo (Canning y col., 1999). Otro microsporidio clasificado en sus inicios erróneamente dentro de *Nosema* es *Paranosema grylli*, que fue definida como sexual por Nasonova y Smirnov en el año 2005 basándose en la existencia de complejos sinaptonémicos en su ciclo de vida.

Como se ha citado antes, en el año 2007 Ironside construyó tres árboles filogenéticos. Éstos se basaban en el estudio de lo que él denominó “grupo *Nosema-Vairimorpha*”, el cual contenía tres especies mal caracterizadas como *Theohania* (Lom y col., 2001; Moodie y col., 2003) junto con especies de *Vairimorpha* y *Nosema*. Tanto las falsas *Theohania* como las *Vairimorpha* del grupo contienen en su ciclo biológico alternancia de fases mono y diplocariotas con evidencias de meiosis, lo que hizo sugerir a Ironside la existencia de un ancestro común sexual para estos tres géneros que perdió, tanto la fase mononucleada en la mayoría de especies de *Nosema*, como la fase sexual en algunas especies de *Vairimorpha*.

Definir la asexualidad de *Nosema* ha sido una cuestión muy espinosa durante mucho tiempo. Aunque en *Nosema* no se han observado complejos sinaptonémicos (Loubès, 1979), ni alternancia de fases mono/diplocariotas (exceptuando *N. bombycis*), y aunque se define asexual por la carencia del gen *DMC1*, la existencia de cariogamia y meiosis en algún momento oculto de su ciclo biológico ayudaría a entender mejor ciertos aspectos del mismo (Loubès, 1979). Hay quien opina que perdió su fase monocariótica junto con su meiosis en el momento evolutivo en que apareció este género, o incluso en varias etapas separadas evolutivamente, pero resulta todo un reto explicar el alto nivel de diversidad de especies al igual que la alta especialización parásito-hospedador viniendo de un linaje eucariota asexual (Ironsides, 2007). Y dentro de este debate, existen resultados de estudios genéticos que siguen apuntando hacia una fase sexual en especies de este género como son los casos de *N. granulosis* o *N. ceranae* (Sagastume y col. 2011; Krebs y col., 2014).

Relevancia de las nosemosis

Los microsporidios forman parte de las listas de patógenos más importantes tanto a nivel de enfermedades infecciosas como de protección medioambiental (Lee y col., 2008) y la relevancia de sus infecciones se extiende desde seres humanos inmunocomprometidos hasta sectores como la agricultura, ganadería, apicultura, alimentación y producción de seda, todos ellos buenos ejemplos de industrias que se han visto, y se siguen viendo muy comprometidas por distintos tipos de microsporidiosis. Esto los coloca en el punto de mira de muchas investigaciones, dentro de las cuales las herramientas genéticas se han puesto al servicio de caracterización de especies, determinación de cargas parasitarias, estudios filogenéticos y proyectos genoma.

En cuanto a las microsporidiosis causadas por el género *Nosema*, o nosemosis, tres microsporidios de transmisión horizontal han sido responsables de pérdidas económicas muy importantes a lo largo de la historia. En el siglo XIX *N. bombycis* puso en jaque la industria de la seda disminuyendo drásticamente la población del gusano *Bombyx mori*; fue gracias al estudio e intervención de Pasteur lo que esencialmente salvó esta industria a nivel

mundial (Frazer, 2008). *N. apis*, descrito por Zander en 1909, es el parásito responsable de la disentería en la abeja de la miel, *A. mellifera*, que ha causado durante años importantes pérdidas económicas en el mundo de la apicultura. Pero la especie más demoledora a este nivel es sin duda *N. ceranae*, descrita en 1996 por Fries y colaboradores como parásito de la abeja oriental *A. cerana*, que se ha convertido a principios del siglo XXI en una epidemia para su nuevo hospedador, *A. mellifera*, con consecuencias devastadoras en colonias a nivel mundial (Higes y col., 2010).

4. Problemática en la apicultura

Las abejas tienen un papel crucial tanto en el mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas, como en la producción agrícola a través de la polinización. En EEUU el valor estimado de la polinización en agricultura asciende a 14.600 millones de dólares y 443 millones en Canadá (Delaplane y Mayer, 2000; Morse and Calderone, 2000). Según la FAO y la Unión Europea, el valor de la polinización es entre 20 y 30 veces más importante que el de la producción de miel (Antúnez y col., 2012).

El mundo de la apicultura se fundamenta en un género de himenópteros de la familia *Apidae*, el género *Apis*, dentro del cual encontramos varias especies y subespecies de abejas polinizadoras y productoras de miel. Aunque, desde un punto de vista estricto, la polinización no es un hecho a estudiar dentro de la apicultura, sí está íntimamente relacionado con ella por el papel fundamental que juegan las abejas a este nivel. Pero las abejas no son los únicos agentes polinizadores, también entre los himenópteros se encuentra el género *Bombus*, formado por unas 240 especies de abejorros, que desempeña un papel polinizador de gran importancia (Plischuk y col., 2009).

Dentro del género *Apis* la especie de abeja más utilizada en la apicultura tanto por su gran productividad de miel, jalea real, propóleos, cera, polen y veneno, como por su alta

capacidad polinizadora, es *A. mellifera*. Esta especie está ampliamente distribuida por el mundo y durante años sus poblaciones se han visto mermadas en mayor o menor medida por una gran variedad de parásitos. Sin embargo, es en la última década cuando las poblaciones de abejas melíferas en todo el mundo se han visto afectadas por un fenómeno de colapso y mortalidad masiva, no conocido hasta el momento (Stocktad, 2007; Parlamento europeo, 2010). Tras el desconcierto inicial sobre la causa real de este fenómeno, a día de hoy se considera que se trata de un fenómeno multifactorial, aunque sin lugar a dudas, los parásitos juegan un papel clave en este proceso (Higes y col., 2008a; Evison y col., 2012; Ravoet y col., 2013; Aufauvre y col., 2014).

De entre los parásitos que afectan a las abejas melíferas, destacan por su patogenicidad y alta prevalencia *Varroa destructor*, *Nosema* spp. y *Acarapis woodi*.

Durante la primera mitad del siglo XX, el ectoparásito *Varroa destructor*, ácaro descrito inicialmente también en *A. cerana* (Anderson y Trueman, 2000), saltó a su nuevo hospedador *A. mellifera* convirtiéndose en la mayor amenaza de la apicultura hasta el momento y obligando, a día de hoy, a seguir un estricto control de varroasis en Europa y EEUU (Rosenkranz y col., 2010).

Relacionados epidemiológicamente con el ácaro *Varroa*, se han descrito unos 18 virus diferentes de ARN infectando abejas; la mayoría de ellos pasan desapercibidos sin provocar grandes daños, pero en ciertos casos pueden ser letales (Allen y Ball, 1996; Chen y Siede, 2007; Stokstad, 2007). El complejo formado por el Virus de Alas Deformadas, (DWV), el Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) y el Virus de la Abeja Kashmir (KBV) en particular se ha descrito como uno de los grandes responsables del colapso de las colonias, aunque su prevalencia suele ser baja (Antúñez y col., 2012; Francis y col., 2013).

Otros parásitos estudiados en relación con los procesos de colapso son *Acarapis woodi*, parásito del aparato respiratorio de la abeja con una alta prevalencia en España (Garrido-Bailón y col., 2012), y los más importantes que afectan a la cría de las abejas como

Ascospaera apis, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* que afortunadamente se suelen encontrar en menor prevalencia (Garrido-Bailón y col., 2013).

En cuanto a las microsporidiosis, el mundo de la apicultura y de la polinización se ven muy comprometidos por las enfermedades causadas por tres microsporidios de transmisión horizontal del género *Nosema*: *N. apis*, *N. ceranae* y *N. bombi*. Los dos primeros se han descrito infectando abejas (Zander, 1909; Fries y col., 1996), y el último, *N. bombi*, fue descrito por Fantham y Porter en 1914 como parásito del género *Bombus*. Se definió como el único microsporidio parásito de este género de himenópteros (Tay y col., 2005) hasta que en el año 2009 Plischuk y colaboradores detectaron la presencia de *N. ceranae* parasitando abejorros.

Hasta el año 2006, *N. apis* era el único microsporidio descrito como parásito de la abeja de la miel *A. mellifera*, a la cual producía lo que en el momento se conocía como “disentería en abejas” (Zander, 1909) y que hoy se conoce como nosemosis tipo A (COLOSS 2009; Higes y col., 2010). Esta enfermedad, extendida a nivel mundial (Furgala y Mussen, 1990), provoca en su fase aguda la aparición de abejas muertas en los colmenares, una disminución en la producción de miel, en la polinización y en la cría de abejas, lo que supone grandes pérdidas económicas (Hornitzky, 1985; Anderson y Giacon, 1992). Este microsporidio parasita las células del ventrículo desde la parte posterior a la anterior produciendo lesiones celulares graves (Kellner, 1981; Fries, 1988; de Graaf y col., 1994). En el momento en el que alcanza las criptas de regeneración, encargadas de reemplazar las células epiteliales, el epitelio queda irreversiblemente dañado (Muresan y col., 1975; Liu, 1984; de Graaf y col., 1994). Esto justifica que en la fase final de la enfermedad, normalmente en primavera, la abeja sufra disentería (Bailey, 1981), y alrededor de la colonia se observen tanto abejas reptando, como muertas (OIE, 2008). También se han descrito casos de colonias altamente parasitadas por *N. apis* en fase crónica invernal sin diarrea (Moeller, 1978).

Pero, como se ha comentado anteriormente, ha sido durante la última década cuando la población de abejas melíferas y diferentes subespecies de *Bombus* han sufrido

pérdidas muy graves dándose asimismo un descenso generalizado en todas las actividades apícolas sobre todo el hemisferio norte (vanEngelsdorp y Meixner, 2009; Potts y col., 2010) causado por lo que en un principio se llamó síndrome del despoblamiento de las colmenas” (Higes y col., 2005). Este síndrome desconcertó a los investigadores ya que su cuadro clínico no coincidía con nada conocido hasta el momento. En el Centro Apícola Regional de Castilla La Mancha (CAR) se detectó este suceso desde finales de los años 90 y principios del 2000, donde la alerta llegaba de los propios apicultores. Pero fue a partir de los años 2004-2005 cuando se empezó a detectar de manera más frecuente y generalizada. Los síntomas se resumían en un descenso en la producción de miel y polen, falta de vigor en las abejas, pérdida de población de abejas adultas y, en la última fase, un colapso de la colonia al no ser ésta capaz de mantener la tasa de renovación de la población, lo que provoca que no nazcan abejas sanas y que las tareas propias de la colmena queden desatendidas, entrando en colapso.

Al ser esta sintomatología desconocida en aquel momento se especuló mucho sobre las posibles causas de este síndrome, abriendo un profundo debate al respecto. En España, primeramente fueron descartados los patógenos ya conocidos (como *Varroa*) del papel central en este fenómeno, al igual que ciertos plaguicidas de nueva síntesis (Higes y col., 2009c). Esto hizo presuponer a *N. apis* como principal responsable de este fenómeno, pese a que ni su cuadro clínico, ni su epidemiología, coincidieran con los descritos para la nueva enfermedad. Pero la hipótesis de *N. apis* se veía apoyada por el alto número de diagnósticos positivos de microsporidios realizados por microscopía de contraste de fases (Martín-Hernández y col., 2007). Posteriormente, se pudo confirmar que prácticamente la totalidad de estos diagnósticos positivos realmente detectaban un aumento exponencial en la prevalencia de un nuevo patógeno no descrito hasta el momento en Europa, *N. ceranae* (Higes y col., 2005; 2006, 2008a; Martín-Hernández y col., 2007), al que se suponía únicamente parasitando la abeja oriental *A. cerana* (Fries y col., 1996). Aunque los primeros casos constatados de este síndrome comenzaran un poco antes, no existen datos que aseguren con exactitud desde cuándo *N. ceranae* se encuentra parasitando la abeja occidental sin haber sido detectada, pero cada vez más estudios apoyan la teoría de una expansión poblacional reciente (Botías y col., 2012a; Roudel y col., 2013; Gómez-Moracho y

col., 2013). Esto confirmaría la hipótesis de que la enfermedad producida por *N. ceranae*, nosemosis tipo C (Higes y col., 2010), sería la responsable de muchos de los casos de mortalidad masiva de colonias de abejas descritos en la última década (Higes y col., 2008a; Botías y col., 2013). El mercado emergente de Asia de productos apícolas da una explicación al salto de este microsporidio a su nuevo hospedador en Europa y, asimismo, abrió una brecha en las antiguas hipótesis sobre esta nueva enfermedad.

Todos estos acontecimientos han provocado que *N. ceranae* haya sido objeto de numerosos estudios de investigación durante los últimos años, volcados primeramente en el estudio de su patogenia, diagnóstico, prevalencia y diseminación, y progresivamente numerosos estudios genéticos, filogenéticos, evolutivos y genómicos.

Por otro lado, existen factores epidemiológicos que pueden modificar la evolución de las enfermedades producidas por todos los patógenos citados. Esto provoca que la evolución de una enfermedad no sólo dependa del parásito, o de la carga parasitaria que presente una colonia. A día de hoy hay descritas numerosas subespecies de abejas a las que se supone con mayor o menor capacidad de respuesta inmunitaria frente a una serie de parásitos (Evans y col., 2006; Huang y col., 2013; Fontbonne y col., 2013). Uno de los factores más importantes a este nivel son los ciclos de cría de la colonia, que varía entre unas subespecies y otras, y están muy relacionados con la climatología de cada zona. La capacidad de repoblar una colmena es crucial para mantenerla a flote durante, por ejemplo, el caso de una microsporidiosis producida por una especie de transmisión horizontal. En este caso renovar la reina de la colmena se convierte en la “cura natural” para evitar el colapso de la colonia (Botías y col., 2012b).

Por otro lado, una colonia puede estar infectada por varios parásitos distintos simultáneamente, debilitándola más rápido y haciendo que alguno de ellos parezca más virulento (Ravoet y col., 2013; Cepero y col., 2014). La realidad es que hacer un estudio comparativo de virulencia de un parásito basado en colmenas de distintos lugares geográficos, con distinta climatología, con posibles parasitaciones paralelas, con distintos

ciclos de cría y con subespecies de abejas diferentes, resulta muy complicado a la hora de extrapolar datos objetivos (Higes y col., 2013b).

4. *Nosema ceranae*

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, *N. ceranae* es un microsporidio de transmisión horizontal (Higes y col., 2009a; Smith 2012; Botías y col., 2013) descrito por Fries y colaboradores en 1996 como parásito de la abeja oriental *A. cerana*, y que ha ganado mucha importancia en investigación en la última década por su salto a un nuevo hospedador, *A. mellifera* (Higes y col., 2005, 2006; Huang y col., 2007) y posteriormente a diferentes especies de abejorros (Plischuk et al., 2009; Graystock et al., 2014).

Características generales

Aunque dentro del género *Nosema* se han descrito especies con inusuales características propias de otros géneros (ver apartado 'El género *Nosema*'), *N. ceranae* verifica pertenecer a su género tanto con su morfología como con su ciclo de vida. Morfológicamente, las esporas de *N. ceranae* son ovaladas de unos 3,3-5,5 x 2,3-3 µm con un filamento polar de entre 18 y 23 vueltas que se enrolla alrededor de dos núcleos (Fries y col., 1996, 2006; Higes y col., 2007, 2008b; Chen y col., 2009a) lo que la hace fácilmente distinguible al microscopio electrónico de *N. apis*, parásito con el que coexiste (Martín-Hernández y col., 2012). Como característica particular, las esporas de *N. ceranae* son más resistentes al calor y a la desecación que las de otras *Nosemas*, lo que le conferiría una mayor resistencia ante situaciones adversas (Fenoy y col., 2009).

En cuanto a su ciclo biológico, las esporas de *N. ceranae* infectan a su célula huésped y entran en fase proliferativa produciendo los clásicos merontes de *Nosema*, en este caso de hasta 4 parejas de núcleos (Fries y col., 1996; Higes y col., 2007), para finalizar con la típica fase esporogónica reducida. Una vez finalizado su ciclo, el proceso infectivo continúa, bien con la salida al exterior de las formas maduras, con la consecuente muerte de la célula huésped, bien con la germinación intracelular de las formas parasitarias maduras, cuyo filamento polar inyecta el esporoplasma en células adyacentes sanas (Higes y col., 2007).

No hay evidencias de cambios en la diplocariogamia a lo largo del ciclo ya que, si en algún caso han sido detectadas formas monocariotas, se han achacado a posibles errores de la técnica de microscopía electrónica.

N. ceranae completa su ciclo de vida dentro de *A. mellifera* en tan solo tres días y gracias a su capacidad de germinación intracelular la eficacia de su infección en este tiempo es muy alta (Higes y col., 2007). Tanto la resistencia de su forma esporulada, como la rapidez y eficacia de su proceso infectivo, fruto de su vía de transmisión horizontal en el hospedador, sumada a su germinación intracelular y a los efectos sobre la fisiología de la abeja (que se desarrollan más adelante en el apartado '*N. ceranae* como agente patógeno en la *Nosemosis* tipo C'), convierte a *N. ceranae* en un patógeno muy virulento.

Reproducción sexual

El ciclo biológico de *N. ceranae* no parece albergar alternancia de fases mono y diplocariotas, lo cual hizo suponer desde un principio que la pauta de reproducción asexual que muchos autores postularon para el género *Nosema* se mantenía también en este caso. Esto provocó que todos los estudios realizados sobre este microsporidio partieran de la base de la expansión clonal dentro del hospedador, una homogeneidad intraespecífica en secuencias codificantes y la acumulación de mutaciones en las no codificantes. Así, estas últimas se convirtieron en marcadores potenciales para caracterización de esas clásicas cepas resultantes de una reproducción asexual tan perseguidas en *N. ceranae*.

En el año 2012, Cuomo y colaboradores realizaron un estudio genómico comparativo de Nematodos con otros organismos, entre ellos *N. ceranae*. En él demuestran que quizá no es tan cierta la idea de que los microsporidios son haploides y asexuales. Con la búsqueda de ortólogos para caracterizar genes de meiosis, ciertos genes parecen mantenerse conservados tanto en nematodos como en microsporidios, con la diferencia de que los microsporidios han perdido el gen *REC8* (cohesina de centrómeros en meiosis) entre otros importantes como *SPO11* (necesario para la iniciación de la recombinación meiótica y formación del complejo sinaptonémico), al igual que varios componentes (*APC1*, *APC4*, *APC5*, y *CDC26*) del complejo promotor de anafase. Pero curiosamente *N. ceranae* rompe con la norma del género *Nosema* al poseer el gen *DMC1*, cuya carencia fue en su día el apoyo de la hipótesis de la asexualidad (Logsdon y col., 1997). Como ya se ha comentado en el apartado 'genomas de microsporidios' la pérdida de material genético codificante en el proceso de reducción genómica no es aleatorio, sino que ocurre en bloques de genes relacionados con una ruta metabólica, de manera que lo que se pierde en realidad es una función celular completa (Keeling y Slamovits, 2004). En el caso de *N. ceranae* los genes de meiosis perdidos son, por ejemplo, el conjunto de los Rec (*REC114*, *REC104*, *REC107*, *REC102*) cuya función tiene que ver con la cohesión y recombinación entre cromosomas homólogos (Cuomo y col., 2012). Sin embargo, otros genes relacionados con la misma función sí están presentes, como *DMC1*, *RAD 51* y *RecA*, íntimamente relacionados entre ellos (Cuomo y col., 2012). Aunque muchos de estos genes tienen que ver con procesos de reparación celular, hay otros positivos para *N. ceranae* con funciones más concretas, como la proteína *Mcp7* específica de meiosis.

En este punto cobran mucho interés varias hipótesis, como la de Halar y colaboradores (2011) sobre la existencia de genes de meiosis en organismos supuestamente asexuales cuyo análisis genético demuestra recombinación homóloga, como es el caso de las secuencias IGS-SSU recombinantes analizadas por Sagastume y colaboradores (2011), trabajo presentado en esta tesis. Por otro lado, Loubès postuló en 1979 que pese a la inexistencia de alternancia de fases mono-diplocariotas en el género *Nosema* y la carencia de ciertos genes de meiosis, como el *DMC1*, la existencia de cariogamia y meiosis en algún momento oculto del ciclo biológico de *Nosema* ayudaría a entender mejor ciertos aspectos

del mismo; igualmente, Ironside en el año 2007 también propuso la idea de que ciertas especies de *Nosema* se comportaban como organismos sexuales, en contraposición a los resultados ultraestructurales obtenidos. En este caso, *N. ceranae* sí posee el gen *DMC1* al igual que otros importantes en meiosis (Cuomo y col., 2012), mientras que por otro lado carece de otros tantos y no muestra estados monocariotas claros en ensayos de microscopía. Sin embargo, el estudio de sus secuencias genéticas (trabajos presentados en esta tesis) apunta, a procesos sexuales ocultos (Sagastume y col., 2011; Gómez-Moracho y col., 2013; Sagastume y col., 2014).

Genes ribosómicos

N. ceranae comenzó a estudiarse en profundidad hace apenas 10 años y los estudios genéticos, junto con la microscopía electrónica, han sido las técnicas más utilizadas para analizar esta especie. Pero hasta el 2013 prácticamente todos los estudios genéticos que se llevaron a cabo se apoyaban en el estudio mediante PCR y secuenciación de los genes ribosómicos, particularmente de la SSU. Esta zona del ADN ha sido utilizada prácticamente en todos los trabajos sobre esta especie, desde su primera caracterización (Fries y col., 1996), pasando por su primera detección en Europa (Higes y col., 2006) hasta su dispersión a nivel mundial (Klee y col., 2007). Desde entonces cada vez más estudios se han basado en estos fragmentos para diagnósticos rápidos mediante PCR dúplex (Martín-Hernández y col., 2007), cuantificación de cargas parasitarias mediante qPCR en colonias infectadas por *N. ceranae* y *N. apis* (Bourgeois y col., 2009; Chen y col., 2009b), construcción de árboles filogenéticos (Chen y col., 2009b; Choi y col., 2011) y búsqueda de evidencias de reproducción sexual (Sagastume y col., 2011), entre otros.

Todo esto supone que, hasta prácticamente la presentación de resultados del proyecto genoma (Cornman y col., 2009), no se disponía de más información genética que unas pocas secuencias completas de unidades de rDNA frente a un número mayor de fragmentos de la SSU. Con la llegada de todas estas secuencias ribosómicas, se demostró que la distribución de las subunidades dentro de cada unidad de repetición en *N. ceranae* es

5'-5S-(IGS)-SSU-(ITS)-LSU-3', siendo la orientación de transcripción del 5S reversa frente al resto de las subunidades, lo cual parece ser una singularidad de esta especie (Huang y col., 2008). Siguiendo la hipótesis de que las "verdaderas Nosemas" contienen una orientación reversa de estas subunidades (Huang y col., 2004; Refardt y Mouton, 2007; Kyei-Poku y col., 2008), *N. ceranae* se consideró una "falsa Nosema" lo cual concordaba con los resultados filogenéticos basados en la SSUrDNA, donde *N. ceranae* se sitúa en clados compartidos por *Nosema* y *Vairimorpha* (Chen y col., 2009b). Estos datos fueron utilizados para apoyar las diferencias entre la patogenia de *N. ceranae* y *N. apis* poniendo en duda la naturaleza del primero dentro del género *Nosema*.

Pero lo que más preocupó sin duda en aquel momento fue la necesidad de encontrar un marcador fiable capaz de diferenciar distintas cepas de *N. ceranae*, y así poder realizar una trazabilidad de las mismas a lo largo de los distintos lugares geográficos donde el microsporidio parecía ser más o menos virulento (Williams y col., 2008c; Whitaker y col., 2011; Yoshiyama y Kimura, 2011; Medici y col., 2012). De esta manera se descartaron las subunidades ribosómicas como marcadores por su supuesta naturaleza conservada y se fijó la atención en los espaciadores del rDNA: el ITS y el IGS. El ITS ya había sido secuenciado y analizado desde los primeros estudios habiéndose definido como un segmento de pocos pares de bases (38 en particular) que, lejos de acumular mutaciones útiles en el estudio de la variabilidad intraespecífica, resultó ser un fragmento muy conservado, probablemente por albergar secuencias de reconocimiento de corte en el momento de la maduración del rRNA. Así pues el IGS fue el primer marcador utilizado para intentar diferenciar supuestas cepas de *N. ceranae* (Huang y col., 2008).

Más tarde, en uno de los trabajos que se presentan en esta tesis (Sagastume y col., 2011), se demuestra que las distintas copias de los genes ribosómicos de este microsporidio no son homogéneas, y que existe una alta variabilidad y recombinación en el fragmento IGS-SSU. Pero, el hecho de que las secuencias de la SSU y LSU fuesen variables no encajaba con la dinámica de uniformidad en las repeticiones de rDNA derivada de la evolución concertada (Nei y Rooney, 2005). Como ya se ha comentado en el apartado 'Ribosomas y genes ribosómicos', la teoría de la mayor uniformidad nucleotídica en copias de rDNA dispuestas

en tándem frente a dispersas tiene sus excepciones en microsporidios. En el caso de *N. ceranae* las copias del rDNA se suponen en tándem aunque no hay estudios que corroboren la existencia de copias dispersas por el genoma, ya que estos genes no fueron incluidos en el ensamblaje del genoma completo de *N. ceranae* (Cornman y col., 2009). Todo esto hace presuponer que todos los procesos implicados en la evolución concertada, tanto los de homogeneización por recombinación como los de nacimiento-muerte de genes, no están actuando en *N. ceranae* para lo cual aún no hay una teoría concluyente. Por otro lado el alto grado de variabilidad y recombinación en el IGS producía un número de haplotipos elevado que distaban mucho de traducirse en resultados de trazabilidad de cepas de *N. ceranae*.

Pero la variabilidad genética encontrada entre las copias del rDNA no sólo aporta información sobre procesos evolutivos, dificulta la creación de árboles filogenéticos y enmaraña el concepto de “cepa” dentro de esta especie. La variabilidad en los genes ribosómicos tiene consecuencias sobre el ARN ribosómico, y por tanto, puede desencadenar posibles cambios potenciales en el funcionamiento del ribosoma. Este tema se aborda en uno de los trabajos presentados en esta tesis (Sagastume y col., 2014).

A raíz de los acontecimientos sobre la variabilidad del rDNA surgió la idea de buscar nuevos marcadores moleculares en otras zonas del genoma para realizar filogenias, como es el caso del gen de la proteína del túbulo polar (*PTP*), propuesto por Hatjina y colaboradores en el año 2011 como marcador codificante variable. Este gen resulta ser muy interesante ya que sus tres variantes *PTP1*, *PTP2* y *PTP3* están directamente relacionadas con el filamento polar y, por tanto, con el inicio del proceso infectivo (Xu y Weiss, 2005) lo que hace de él un gran candidato para el estudio de variantes genéticas de *N. ceranae* ligadas a las diferentes virulencias del proceso infectivo en condiciones de campo y laboratorio (Van der Zee y col., 2014).

A día de hoy los estudios puramente genéticos basados en cada vez más marcadores moleculares siguen siendo los más utilizados, y muchos están orientados a extrapolar datos propios de la naturaleza y comportamiento de *N. ceranae*, como por ejemplo la teoría de la expansión poblacional reciente (Botías y col., 2012a; Roudel y col., 2013; Gómez-Moracho y

col., 2013), las consecuencias en el desarrollo celular de la variabilidad ribosómica (Sagastume y col., 2014), y la búsqueda exhaustiva de evidencias de esos procesos sexuales que no se ven, pero se reflejan en los resultados genéticos de cada trabajo basado en *N. ceranae*.

Genoma

En el año 2009 Cornman y colaboradores secuenciaron el genoma completo de *N. ceranae* declarando que este trabajo fue una tarea ardua, complicada y con resultados relativos e incompletos. Esto se debió, entre otras cosas, a la cantidad elevada tanto de pares A-T como de fragmentos repetidos, además de que la cantidad de puntos polimórficos (tanto SNPs como INDELS) se estimó en 1.0 por kilobase. Según la técnica WGS (Whole-Genome Shotgun) la secuenciación completa del genoma de *N. ceranae* asciende en el mejor de los casos a 9,8 Mb, pero al aumentar los filtros basados en pares G-C la cifra se reduce a 8,6 Mb. Por otro lado, a Cornman y colaboradores les resultó imposible valorar el número de cromosomas de este organismo por la técnica de electroforesis en campo pulsado. Pero esta técnica ya había sido utilizada por otros autores no sólo con el fin de un estudio cromosómico, sino también para determinar el tamaño aproximado de un genoma; en los casos estudiados de microsporidios, el género *Nosema* pertenecía al rango genómico de 7,4-15 Mb (Méténier y Vivarès, 2001), de manera que el dato obtenido de 8,6-9,8 Mb para el genoma de *N. ceranae* no rompía con esta regla.

El ensamblaje del genoma fue complicado y finalmente se realizó sólo con 7.86 Mb; se identificaron 2.641 genes de entre los cuales un 50% eran propios de microsporidios. La densidad genética es de unos 0.60 genes/kb (64.8% de secuencias codificantes), cifra menor que otras especies como *E. cuniculi* o *A. locustae* (0.94 y 0.97 genes/kb, respectivamente) pero mayor que otras especies descritas con densidades muy bajas (Slamovits y col., 2004b; Williams y col., 2008a). Esto no es de extrañar teniendo en cuenta que las densidades génicas más altas en microsporidios se encuentran en los genomas más pequeños, donde intrones y secuencias intergénicas son prácticamente inexistentes y los fragmentos

repetidos muy poco frecuentes, mientras que las densidades bajas se encuentran, lógicamente, en los genomas más grandes que sí poseen todos estos elementos no codificantes además de ciertos transposones (ver apartado 'genomas reducidos'). Así pues, el genoma de *N. ceranae* con alrededor de 9kb y una densidad génica de 0.6 genes/kb se considera un genoma de tamaño medio con una cantidad importante de fragmentos no codificantes que forman parte de numerosos elementos repetidos, espaciadores intergénicos e intrones. Estos últimos son de pequeño tamaño y se encontraron en cinco tRNAs al igual que en otros seis genes que codifican para la proteína ribosómica S4.

Los fragmentos de ADN secuenciados en el proyecto pero no incluidos en el ensamblaje eran principalmente secuencias repetidas, tanto no codificantes, como ORFs (Open Reading Frames), como secuencias de genes ribosómicos. En particular estos últimos no se pudieron incluir en el proyecto por su alto grado de polimorfismo, lo cual, según los autores, resultaba ser "recalcitrante" para los parámetros de ensamblaje de esta técnica.

En cuanto a las secuencias codificantes, de los supuestos 2.641 genes de *N. ceranae*, 1.252 son ortólogos de *E. cuniculi*, esto es un 47,9%, dato no demasiado alto si lo comparamos con el 82,8% de *E. bieneusi* (Akiyoshi y col., 2009). Los otros 1.119 genes (42,8%) no tuvieron coincidencias ni con *E. cuniculi* ni con ningún otro organismo en el BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y dentro de este grupo se detectaron 5 familias de genes con al menos 10 miembros cada una.

En lo que se refiere a elementos transponibles, dos familias de genes exclusivos de *N. ceranae* parecen ser miembros de la superfamilia de transposones *Merlin* (Feschotte, 2004) pero las dificultades del proyecto y del ensamblaje de secuencias en este caso no puede asegurar totalmente este dato. No ocurre lo mismo con los elementos transponibles del tipo *gypsy-type LTR retrotransposons* con los que sí se encontraron alta homología, al igual que ocurre en *N. bombycis* (Xu y col., 2006). En definitiva es muy común en *N. ceranae* encontrar secuencias codificantes dentro de transposones como *Merlin*, *Helitron*, *piggyBac* y *MULE*. Lo que sí parece ser poco frecuente a este nivel es la presencia de elementos transponibles por la acción de la transcriptasa inversa. La presencia de elementos egoístas en genomas

reducidos es una línea de investigación muy interesante ya que proporcionaría mucha información sobre el proceso de compactación genómica y sobre la transferencia de genes desde el hospedador al parásito por HGT.

En cualquier caso, las proteínas propias de *N. ceranae*, bien provenientes de genes fijos, bien de genes en elementos transponibles, representan una gran parte del material codificante lo que sugiere una posible expansión genómica (Cornman y col., 2009), al igual que ocurre en otros microsporidios (Williams y col., 2008a; Gill y col., 2008). Esta hipótesis se puede ver respaldada con los datos del tamaño medio del genoma, el alto número de elementos repetidos y la presencia de intrones, e igualmente concuerda con la plasticidad evidente de *N. ceranae* a la hora de parasitar a un nuevo hospedador, como ha sido el caso de *A. mellifera* (Higes y col., 2005), *A. florea*, *A. dorsata*, *A. Koschevnikovi* (Botías y col., 2009, Chaimanee y col., 2010) y especies del género *Bombus* (Plischuk y col., 2009; Li y col., 2012; Graystock y col., 2014).

***N. ceranae* como agente patógeno en la nosemosis tipo C**

Desde la primera detección de *N. ceranae* en España, en el año 2005 (Higes y col., 2005, 2006), su efecto sobre la abeja individual y sobre la colonia ha sido muy debatido ya que, mientras algunos trabajos demostraban su papel central en el denominado “síndrome de despoblamiento de las colonias” (Higes y col., 2005, 2006; Martín-Hernández y col., 2007), otros la presuponían similar a su mal llamada “prima hermana” *N. apis*, considerando al “nuevo microsporidio” más un comensal que un patógeno (Pajuelo y col., 2008). Esta última hipótesis no tardó mucho en ser descartada al observarse un comportamiento muy diferente en las colonias infectadas por *N. ceranae* (Higes y col., 2005, 2008a) y una mayor mortalidad que en los casos de infección por *N. apis* (Paxton y col., 2007). De esta manera *N. ceranae* se convirtió en el principal sospechoso de lo que inicialmente se denominó “síndrome del despoblamiento de las colmenas” (Higes y col., 2005) y, posteriormente y tras un análisis más profundo, nosemosis tipo C (COLOSS 2009; Higes y col., 2010). Es importante recalcar que esta enfermedad no había sido observada en Europa hasta la descripción de *N.*

ceranae. Así, se pudieron diferenciar aquellos casos clínicos debidos a este patógeno exótico, frente a los casos clínicos provocados por patógenos endémicos de nuestro país, fundamentalmente *Varroa destructor*. Igualmente, también se detectaron los casos en los que otros agentes nosógenos, como plaguicidas, se confundían erróneamente con lo que en realidad era emergente, la nosemosis tipo C. Esta enfermedad ha sido caracterizada como asintomática y, tras un periodo infectivo de entre 1,5-2 años, produce un descenso muy llamativo de la cantidad de abejas adultas, haciendo que la colonia quede despoblada y muera (Higes y col., 2008a; Botías y col., 2013).

N. ceranae se desarrolla dentro de las células del ventrículo de *A. mellifera* de una manera similar a *N. apis* (Fries y col., 1996; Higes y col., 2007; Chen y col., 2009a). En menos de tres días tras la infección, se pueden observar tanto esporas maduras como vacías dentro de la célula hospedadora (Higes y col., 2007), lo cual indica que la germinación de *N. ceranae* dentro de *A. mellifera* es también intracelular y que las nuevas esporas infectivas resultantes de un ciclo biológico en una célula huésped son capaces de transmitirse horizontalmente a una célula sana adyacente. Este hecho no parece producirse dentro del hospedador original, *A. cerana* (Fries y col., 1996) en el que se observan células infectadas aisladas rodeadas de células sanas, lo que supone una colonización del ventrículo más lenta y, por tanto, un daño más progresivo.

Por otro lado, resulta curioso que siendo las lesiones anatomopatológicas producidas por *N. apis* y *N. ceranae* tan similares, los efectos sobre abejas individuales y sobre la colonia de abejas en general no coincidan, y produzcan dos cuadros clínicos muy diferentes (Martín-Hernández y col., 2012; Botías y col., 2013). Y lo que aún sorprende más es la ausencia de disentería en las abejas tras infecciones por *N. ceranae*. Si el daño en el epitelio ventricular es equivalente, la disentería debería ser un síntoma presente en ambos casos. Sin embargo, en la nosemosis tipo C no se han observado ninguno de los síntomas de la tipo A (producida por *N. apis*), en particular la diarrea, sin tener a día de hoy ninguna hipótesis demostrada al respecto (Higes y col., 2008a).

Continuando con los efectos a nivel ventricular, además de lesiones irreversibles en el epitelio celular (Higes y col., 2007), *N. ceranae* provoca un aumento del estrés oxidativo conjuntamente con una inhibición de la expresión de ciertos genes implicados en mantener la homeostasis y renovación de los tejidos ventriculares (Dussaubat y col., 2012). A nivel molecular *N. ceranae* también es capaz de inhibir la expresión de genes relacionados con la inmunidad de la abeja (Antúnez y col., 2009; Chaimanee y col., 2012) e incluso los mecanismos de apoptosis celular (Higes y col., 2013a), como ocurre en otros microsporidios como *N. algerae* o *Encephalitozoon* spp. (Scalon y col., 1999; del Águila y col., 2006).

Paralelamente a los daños en el ventrículo, *N. ceranae* afecta tanto a la capacidad de vuelo de la abeja (Krajl y Fuchs, 2010; Alaux y col., 2014; Wolf y col., 2014) como a su conducta alimentaria debido al estrés energético que provoca en su organismo (Mayack y Naug, 2009; Naug y Gibbs, 2009; Martínez y col., 2011; Holt y col., 2013). Por otro lado, se ha detectado un aumento significativo de la feromona primaria etil oleato (EO) en las abejas infectadas por *N. ceranae* (Dussaubat y col., 2010), al igual que de la hormona juvenil (JH) (Ares y col., 2012; Goblirsch y col., 2013), lo que provoca una maduración precoz de las abejas infectadas, y una rápida transición de abeja de interior a pecoreadora (Leoncini y col., 2004). El hecho de que las abejas enfermas abandonen la colonia prematuramente y vean alterada su capacidad de orientación para regresar a la colmena (Wolf y col., 2014), da una explicación plausible al proceso de despoblamiento de la colonia por la pérdida de abejas adultas. Por otro lado, también se explica el por qué no se han observado los mismos síntomas en abejas infectadas por *N. ceranae* y *N. apis*; al no regresar las abejas parasitadas a la colonia, no es posible comparar objetivamente ambos cuadros clínicos. Además, la alteración hormonal de la abeja pone en peligro la homeostasis de la colonia al favorecer el abandono prematuro de la colmena, haciendo que ésta pierda la capacidad de compensar la muerte precoz de las pecoreadoras infectadas, y desembocando así en el colapso final (Higes y col., 2008a; Khoury y col., 2011, 2013).

Pero, como se ha comentado en el apartado de 'problemática en la apicultura', la colonia tiene sus propios mecanismos de defensa contra este tipo de parásitos, como es el caso de los ciclos de cría y el polietismo. En el caso de la nosemosis tipo C, la colonia

consigue mantener la homeostasis, renovando su población con abejas sanas (Khoury y col., 2011), a lo que hay que sumar el hecho de que las abejas enfermas maduran de manera precoz, realizando tareas fundamentalmente en el exterior (pecorea) muriendo lejos de la colmena (Higes y col., 2008a; Wolf y col., 2014), lo que hace descender la probabilidad de infectar a las nuevas generaciones de abejas en el interior de la colmena. De estas dos maneras una colonia infectada por *N. ceranae* se puede mantener sin colapsar. Esta situación se conserva siempre y cuando el grado de parasitación no supere unos límites determinados (Higes y col., 2008a), ya que de ser así, la cantidad de abejas infectadas que maduran de manera precoz y mueren fuera de la colmena no puede ser compensada con las nuevas generaciones de abejas no infectadas, con lo que no se renueva la población y la colonia se colapsa y muere (Khoury y col., 2011, 2013).

Por otro lado, la renovación de la reina de una colonia es una práctica habitual cuando la cría se ve comprometida, pero esta técnica puede traer consecuencias negativas inesperadas. Por un lado, el renovar con reinas sanas colonias enfermas garantiza su mantenimiento (Botías y col., 2012b; Muñoz y col., 2014), pero la importación/exportación de reinas de determinadas subespecies de *A. mellifera*, que previamente han estado en contacto con *N. ceranae*, ha facilitado la dispersión del patógeno por otras zonas geográficas (Mutinelli, 2011).

La prevalencia de la nosemosis tipo C es alta y se mantiene a lo largo de todo el año (Fenoy y col., 2009; Martín-Hernández y col., 2012). Esto precisamente supone una de las grandes diferencias entre la nosemosis tipo C y la tipo A. Así mientras que *N. apis* no se detecta en la colonia de abejas durante todo el año por su baja tolerancia a las temperaturas extremas (Botías et al., 2012a; Martín-Hernández y col., 2012), *N. ceranae* demuestra tener más plasticidad y más resistencia a estas condiciones climáticas lo que hace que su proceso infectivo sea más eficaz y se mantenga a lo largo de las cuatro estaciones (Fenoy y col., 2009; Martín-Hernández y col., 2012). Esta gran diferencia en cuanto a la prevalencia en las colonias de abejas hace que la nosemosis tipo A se considere, en general, un problema menor, mientras que la nosemosis tipo C se considera un problema de sanidad mayor, tanto

para la abeja individual (Paxton y col., 2007; Antúnez y col., 2009; Martín Hernández y col., 2009) como en el conjunto de la colonia (Higes y col., 2008a; 2009b; Goblirsch y col., 2013).

Epidemiología de la nosemosis tipo C

Aunque durante los últimos años se haya debatido profundamente sobre el porqué de esta nueva situación crítica en el mundo de la apicultura, y se haya intentado dar una explicación basándose en otros agentes, *N. ceranae* es sin duda el parásito con mayor prevalencia a día de hoy con un cuadro clínico muy definido que encaja a la perfección con la sintomatología de las colonias de abejas a nivel mundial, lo cual lo convierte en el principal sospechoso responsable de esta situación.

Como se ha comentado en apartados anteriores, no existen datos que aseguren con exactitud desde cuándo está *N. ceranae* parasitando *A. mellifera* fuera del continente asiático sin haber sido detectada, pero cada vez más estudios apoyan la teoría de una expansión poblacional reciente (Botías y col., 2012a; Roudel y col., 2013; Gómez-Moracho y col., 2013). Siguiendo esta teoría, desde la primera detección el año 2005 (Higes y col., 2005) de *N. ceranae* en España, el parásito se ha extendido por los cinco continentes con una rapidez asombrosa (Klee y col., 2007) infectando colonias de climas tanto fríos como cálidos, llegando a detectarse en varias subespecies diferentes de abejas (Botías y col., 2009; Chaimanee y col., 2010) e incluso en especies de abejorros (Plischuk y col., 2009; Li y col., 2012). Esto demuestra una gran plasticidad y adaptabilidad, dos factores que suponen una ventaja importante frente al resto de los parásitos descritos en apicultura.

En cuanto a su rápida diseminación, la gran actividad de la industria apícola ayuda considerablemente a la dispersión de las esporas que pueden hallarse en polen, reinas y abejorros. Si a esto se le suma la diseminación natural, donde las abejas de cada colonia interactúan entre ellas y donde los zánganos son capaces de cubrir hasta 15 km con libre acceso a cada colonia, la dispersión de *N. ceranae* está garantizada.

Capítulo I

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Análisis preliminar del rDNA de *Nosema ceranae*

Los genes ribosómicos son marcadores de primera elección a la hora de analizar nuevas especies, ya que se encuentran repetidos por genoma y sus copias se suponen idénticas dentro de una misma especie. En el caso del microsporidio *N. ceranae*, parásito de la abeja melífera occidental, múltiples trabajos se han basado en el rDNA para identificación, construcción de filogenias moleculares, búsqueda de variabilidad intraespecífica relacionada con distintos grados de virulencia del parásito y cuantificación de cargas parasitarias mediante *q*-PCR. En particular, el gen de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU) y la zona adyacente al final del gen de la subunidad grande (LSU) han sido de especial interés para muchos investigadores. No obstante, nuestros estudios preliminares del gen de la SSU muestran cromatogramas con claros solapamientos de secuencias, lo cual evidencia heterogeneidad en el ADN molde. Por otro lado, la existencia de fuertes bandas inespecíficas en las electroforesis de la zona adyacente a la LSU imposibilitan una secuenciación directa del producto de PCR.

Este trabajo responde a la necesidad de caracterizar las zonas más utilizadas del rDNA de *N. ceranae* mediante clonaje de cada producto de PCR con el fin de aportar información sobre la naturaleza variable de estos genes y sus espaciadores. Con ello se permitirá definir zonas seguras para el diseño de futuros análisis genéticos.

Introducción

Los genes ribosómicos son marcadores moleculares de elección rutinaria a la hora de abordar el estudio de especies nuevas, tanto en clasificaciones taxonómicas como en estudios de variabilidad intraespecífica. El rDNA es un claro ejemplo de genes repetidos a lo largo de un genoma, cuyas copias siempre se han supuesto si no idénticas, con una alta uniformidad dentro de una misma especie (Nei y Rooney, 2005; Ueno y col., 2007) gracias a procesos de homogenización genética conocidos como “evolución concertada” (Dover y Coen, 1981). Pese a que ciertas especies de microsporidios rompen esta regla mostrando variabilidad entre sus copias (Gatehouse y Malone, 1998; Tay y col., 2005; O’Mahony y col., 2007), algunos estudios filogenéticos sobre *N. ceranae* se han basado en estos marcadores (Chen y col., 2009a; Choi y col., 2011; Michalczyk y col., 2013).

Cada unidad de repetición del rDNA en microsporidios consta de la subunidad pequeña (SSU), un segmento transcrito interno (ITS), la subunidad grande (LSU), la subunidad 5S y un espaciador intergénico (IGS). La

disposición de estas subunidades es diferente según la especie, lo cual provoca que el IGS no siempre se encuentre separando los mismos fragmentos. Dentro del género *Nosema*, existen especies cuyas copias de rDNA están organizadas como 5’-SSU-ITS-**LSU**-3’ y otras como 5’-**LSU**-ITS-SSU-3’, siendo la localización de la subunidad 5S variable entre especies (Huang y col., 2004; Ironside, 2007). En el caso de *N. ceranae*, la disposición es 5’-5S-IGS-SSU-ITS-**LSU**-3’ con la peculiaridad de una orientación transcripcional inversa en la subunidad 5S con respecto al resto (Huang y col., 2008). Según la secuencia completa de *GenBank* DQ486027, la SSU de *N. ceranae* está compuesta por 1259 pb, el ITS de 38 pb y la LSU de 2529 pb.

Asumiendo los genes ribosómicos conservados dentro de una misma especie, son los fragmentos no codificantes los que ganan importancia a la hora de buscar diferencias, tanto inter como intraespecíficas. El segmento transcrito interno, o ITS, es un fragmento de ADN ribosómico no codificante que está considerado como un “código de barras” a la hora de diferenciar genéticamente distintas especies de hongos (Schoch y col., 2012), y ha sido

muy utilizado con este fin en microsporidios (Huang y col., 2008; Santin y Fayer, 2009; Sak y col., 2011; Wilkinson y col., 2011; Li y col., 2012).

La disposición bien dispersa, bien en tándem, de las copias de rDNA de *N. ceranae* dentro de su genoma es una cuestión aún sin resolver (Cornman y col., 2009). Inicialmente, se tomó el ejemplo de *N. apis* como referencia más cercana, aprovechando la similitud en la organización interna de las subunidades ribosómicas dentro de cada unidad de repetición (5'-SSU-ITS-LSU-3'). En este microsporidio están descritas 3 unidades completas de rDNA dispuestas en tándem (Gatehouse y Malone, 1998), y por tanto se presupuso una organización parecida en *N. ceranae*, sin olvidar que la existencia de unidades dispersas podría ocurrir, como pasa en otras especies de *Nosema* (Liu y col., 2008).

Desde los primeros estudios genéticos de *N. ceranae*, el rDNA, y en particular la SSU, ha sido el marcador por excelencia en estudios de filogenias, donde una gran cantidad de trabajos se orientaron hacia la búsqueda de variabilidad intraespecífica útil a la hora de

distinguir posibles cepas de este patógeno. Y es que la caracterización de cepas relacionadas con cuadros clínicos más o menos virulentos en colonias parasitadas por *N. ceranae* ha sido uno de los objetivos más perseguidos en la investigación de este parásito.

Por otro lado, existe una zona más allá de la supuesta terminación de la LSU donde varios autores han diseñado experimentos de *q*-PCR con sondas de ADN tanto para identificación, como para cuantificación de cargas parasitarias de *N. ceranae* (Chen y col., 2009b; Bourgeois y col., 2009). Esta zona, adyacente a la LSU, se corresponde con ADN no codificante y en la secuencia de referencia de *GenBank* DQ486027 se aprecia una repetición en tándem de 92 pb que se repite dos veces. Es de suponer que el grado de variabilidad en esta zona será alto, por lo que conocer con exactitud la naturaleza de este fragmento es muy importante de cara a posibles interpretaciones erróneas de resultados.

Por ello, en este primer trabajo se aborda el estudio de las zonas más utilizadas en estudios genético-moleculares del rDNA de *N. ceranae*

mediante PCR, clonaje y secuenciación, con el fin de estudiar la naturaleza de ambas subunidades, SSU y LSU, y de los espaciadores ITS, IGS y la zona no codificante adyacente al final de la LSU. El objetivo principal consiste en caracterizar las zonas polimórficas y conservadas que sirvan de guía en futuros trabajos, además de esclarecer la posible existencia de copias de rDNA organizadas en tándem.

Material y métodos

Las 11 muestras analizadas provienen de varias colmenas de *A. mellifera* y *A. cerana* procedentes de varios puntos de España y Oceanía, recolectadas entre los años 2005 y 2010 (tabla 1). Las muestras procedentes de España pertenecen al Laboratorio de Patología del Centro Apícola Regional de Castilla La Mancha, y las de Australia fueron gentileza de la Doctora Sharon de Wet (Departamento de Trabajo, Innovación y Desarrollo Económico del Recinto de Ciencias Alimentarias y de la Salud de Coopers Plains). Las muestras analizadas son extractos de ADN aislado y purificado según el método de Martín-Hernández y colaboradores (2007) y

proceden bien de un macerado de varias decenas de abejas, bien de una sola abeja individual (tabla 1).

Para amplificar y secuenciar las diferentes regiones del rDNA y sus zonas adyacentes, se diseñaron varias parejas de cebadores: NOS1, NOS2, NOS3, NOS4, R2, R3 y P-LSU, utilizando para ello como referencia las secuencias disponibles en *GenBank* DQ486027 (Taiwan) y EF091880 (España). El diseño de todos los cebadores se realizó con el programa informático OLIGO 6.0 y sus secuencias están indicadas en la tabla 2. Las PCRs en este trabajo están diseñadas para cubrir tanto secuencias de los genes ribosómicos como zonas no codificantes del rDNA (fig. 1): un primer bloque incluye las últimas 60 pb del 5S, el IGS, SSU e ITS completos, y las primeras bases de la LSU amplificadas mediante los cebadores NOS3, R3 y R2, y por otro lado, un segundo bloque engloba los últimos 1005 pb de la LSU y el fragmento no codificante adyacente, amplificadas con los cebadores NOS4 y P-LSU, respectivamente. La única zona del rDNA sin analizar comprende 1240 pb, aproximadamente, en la zona media de la LSU.

Tabla1. Extractos de ADN analizados y características de las muestras biológicas iniciales, tales como localización geográfica de las colonias de abejas, año de recolección de la muestra, características de la muestra biológica inicial (macerado de varias decenas de abejas o abeja individual), y por último, hospedador.

AISLADO	CARACTERÍSTICAS			
	LOCALIZACIÓN	AÑO DE RECOLECCIÓN	FUENTE BIOLÓGICA	HOSPEDADOR
816	BADAJOS	2005	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
889	CUENCA	2005	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
853	ZAMORA	2005	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
NP7-1	GUADALAJARA	2007	ABEJA INDIVIDUAL	<i>Apis mellifera</i>
NP7-2	GUADALAJARA	2007	ABEJA INDIVIDUAL	<i>Apis mellifera</i>
P3-1	GUADALAJARA	2007	ABEJA INDIVIDUAL	<i>Apis mellifera</i>
TF	GUADALAJARA	2010	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
TFF	GUADALAJARA	2010	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
3-A	AUSTRALIA	2006	MACERADO	<i>Apis mellifera</i>
7-A	AUSTRALIA	2009	MACERADO	<i>Apis cerana</i>
8-A	AUSTRALIA	2010	MACERADO	<i>Apis cerana</i>

Tabla 2. Parejas de cebadores, sus secuencias nucleotídicas, temperatura de anillamiento de cada PCR y tamaño de los amplicones. El amplicón resultante de la PCR con la pareja de cebadores P-LSU (marcado con un asterisco) se corresponde con el valor previsto en el momento del diseño; empíricamente esta PCR produce fragmentos específicos de varios tamaños.

Cebadores	Secuencia	Tª PCR (°C)	Amplicón (pb)
NOS1_UP NOS1_LOW	5'-GCATGTTTTGACATTTGAAA-3' 5'-GCGTTGAGTCAAATTAAGC-3'	63,0	750
NOS2_UP NOS2_LOW	5'-CGGCTTAATTTGACTCAAC-3' 5'-TCCTCCTTTAATGATATGCT-3'	58,3	670
NOS3-UP NOS3-LOW	5'-ACTGGCTTAACTTCGGAGAG-3' 5'-AAGTAATACCGTTACCCGTCA-3'	57.2	890
NOS4-UP NOS4-LOW	5'-CCGTACCTATACCGCATCAG-3' 5'-CCTTAATCGAAATGACGTAGC-3'	55.0	1005
R2-UP R2-LOW	5'-AGCAGCCGCGGTAATACTTGT-3' 5'-TCTTGTTCACTCGCCGCTACT-3'	63,3	1086
R3-UP R3-LOW	5'-TTACTGGCTTAACTTCGGAGAG-3' 5'-GGTATCTAATCATCTTCGCTCCT3'	57,0	1300
P-LSU-UP P-LSU-LOW	5'-ACCACTGGTAGTGCGATTAAC-3' 5'-CGGCAATGGGTCTACTCAC-3'	59,9	557*

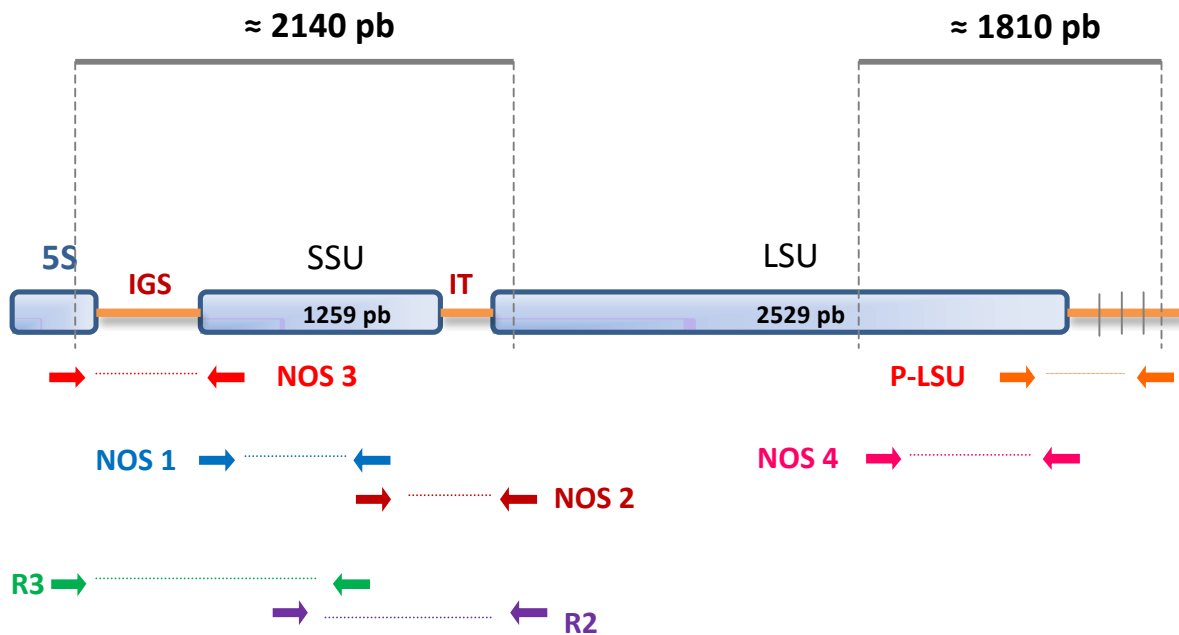


Figura 1. Esquema completo de una unidad de rDNA de *N. ceranae* con la localización aproximada del anillamiento de los cebadores utilizados, tanto en amplificación por PCR como en secuenciación.

El protocolo de PCR parte de diluciones 1/10 y 1/50 de cada aislado inicial de ADN, elegidos de manera aleatoria para un cribado inicial de cada zona, 10 nmol de cada nucleótido, 5 pmol de cada cebador, 1,5 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, cat no.11509-015), tampón de la enzima, 0.5 µL de Cloruro de Magnesio 50 mM, 12 µg de Albúmina de suero bovino (BSA) (Roche Diagnostic, cat no. 10711454001) y agua destilada estéril hasta un volumen final de 25 µL. Se han empleado termocicladores PT-100TM (MJ Research,

Inc.) y termocicladores Eppendorf Mastercycler EpGradient S y Pro S con el siguiente programa de PCR: un primer paso de desnaturalización de 94°C durante 2 minutos, seguido de entre 35 y 45 ciclos de 94°C 1 min, temperatura de anillamiento de cada pareja de cebadores (tabla 2) 1 min, 68°C 90 s para fragmentos de más de 1000 pb y 60 s para fragmentos menores, y un último paso de 7 min a 68°C; a continuación la mezcla de reacción se enfría automáticamente a 4°C.

Las electroforesis se llevaron a cabo de dos maneras: (i) En geles tradicionales de agarosa D2 (Pronadisa, cat no. 8033), a distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos a analizar, con 0,00006% de bromuro de etidio, en tampón TBE (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1mM pH=8, agua destilada). En este caso, cada producto a analizar se mezcló con 2 μ L de tampón de carga azul de bromofenol (0,05% azul de bromofenol, 40% sacarosa, 0,5% SDS y 0,1M EDTA pH=8) antes de ser introducido en el gel. Estas electroforesis se realizaron a 100 V durante 25 minutos. (ii) En geles de agarosa generales de Invitrogen E-GEL 2% Agarose GP (cat no. G8008-02) y E-Gel 1.2% Agarose GP (cat nº. G5018-01) en cubetas Invitrogen E-GEL® iBAsE™ Power System (cat no. G6400, G6400EU, G6400UK).

En un primer momento, los productos de PCR NOS1 fueron purificados con el kit de Qiagen QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT (50), cat no. 28104, y secuenciados directamente en GENYCA INNOVA S.L. (Majadahonda). Al obtenerse secuencias superpuestas, cada producto de PCR se clonó con el kit de Invitrogen TOPO TA Cloning, cat nº 4500-01, en el

vector PCR 2.1-TOPO (3.9 kb). Para ello, se siguieron las especificaciones del fabricante con algunas particularidades: se partió de 4 μ L de producto de PCR y los tiempos de incubación fueron de 20 minutos para el ligamiento del inserto y el vector, y de 30 minutos para la reacción del vector modificado junto con las bacterias competentes (TOP10, incluidas en el kit).

Las bacterias transformadas se sembraron en placas petri con medio LB con ampicilina (0,01% Triptona, CULTIMED cat no. 403682.1210; 0.005% extracto de levadura, CULTIMED cat no. 403687.1210, 0,01% NaCl, PRS PANREAC cat no. 141659, 0,015% Agar Bacteriológico, CULTIMED cat no. 402302.1210, con pH 7, 0.001% ampicilina 50 mg/mL, SIGMA cat no. A9393-5G, 1.6 μ g X-GAL/placa, VWR cat nº. 437132J). Tras la incubación a 37°C toda la noche, se seleccionaron las colonias blancas, que crecieron aisladas en medio LB líquido con ampicilina (0.01% Triptona, 0.005% extracto de levadura, 0.01% NaCl, pH 7, 0.001% ampicilina 50 mg/mL) durante toda la noche. El aislamiento y purificación del ADN plasmídico se realizó a partir del pellet de 4 mL de células en cultivo con el kit de

Qiagen “Qiaprep Spin Miniprep Kit (250)”, cat no. 27106, siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN extraído se reveló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8% ó E-GEL 1.2% (véanse referencias arriba). Para seleccionar los clones con el inserto deseado y su posterior secuenciación se realizó la digestión de 5 µL de cada extracto de ADN plasmídico con 4 unidades de la enzima de restricción Eco-RI (New England Biolabs, cat no. R0101S) con su tampón correspondiente, y agua hasta un volumen final de 25 µL. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche. Todo el producto de digestión se cargó en un gel de agarosa 1% o en E-GEL 1.2%, y se llevó a cabo la electroforesis. Los clones con el inserto del tamaño deseado fueron seleccionados para su posterior secuenciación en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares (Facultad de Ciencias Ambientales, Campus universitario de Alcalá de Henares) y en la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid (Campus de Cantoblanco). Para la secuenciación se utilizaron tanto los cebadores comerciales M13, como los NOS1-*forward* y NOS2-*forward* para las zonas centrales de los

fragmentos R3 y R2, respectivamente. El análisis de secuencias se llevó a cabo con el programa BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall, 1999) y se utilizó el algoritmo CLUSTAL W (Thompson y col., 1994) para los alineamientos.

En total se obtuvieron 145 secuencias de clones que se alinearon juntas para aportar información de los genes de la SSU (completa), 5S y LSU (parcial), además de los espaciadores IGS e ITS (completos) y la zona no codificante adyacente a la LSU (parcial). De estos 145 clones, 47 corresponden al fragmento NOS3, el cual amplificó las muestras TF y TFF; 10 clones pertenecen a R3, en donde se utilizaron las tres muestras australianas como molde (7-A, 3-A y 8-A); 16 clones son R2 y fueron aislados de las muestras españolas NP7-1, NP7-2 y P3-1; NOS4 amplificó las tres muestras españolas 816, 853 y 889 de las que se obtuvieron 24 clones; las mismas muestras se utilizaron para el análisis P-LSU, del que se extrajeron 48 clones.

Con el fin de encontrar algún dato sobre la naturaleza de ciertas inserciones encontradas en clones P-LSU, las secuencias se han contrastado con la

herramienta BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Resultados

Las electroforesis de las PCRs NOS1, NOS2, NOS3, NOS4, R2 y R3 mostraron una sola banda de ADN correspondiente al producto de PCR esperado, pero si las

condiciones de PCR se fuerzan para una mayor amplificación aparecen bandas inespecíficas más tenues de mayor tamaño (fig. 2). Sin embargo, la electroforesis de las PCR P-LSU deja ver claramente un número de bandas de distintos tamaños e igual intensidad que se repite en cada aislado amplificado (fig. 2), dato que concuerda con la repetición en tándem existente en la secuencia de referencia de *GenBank*.

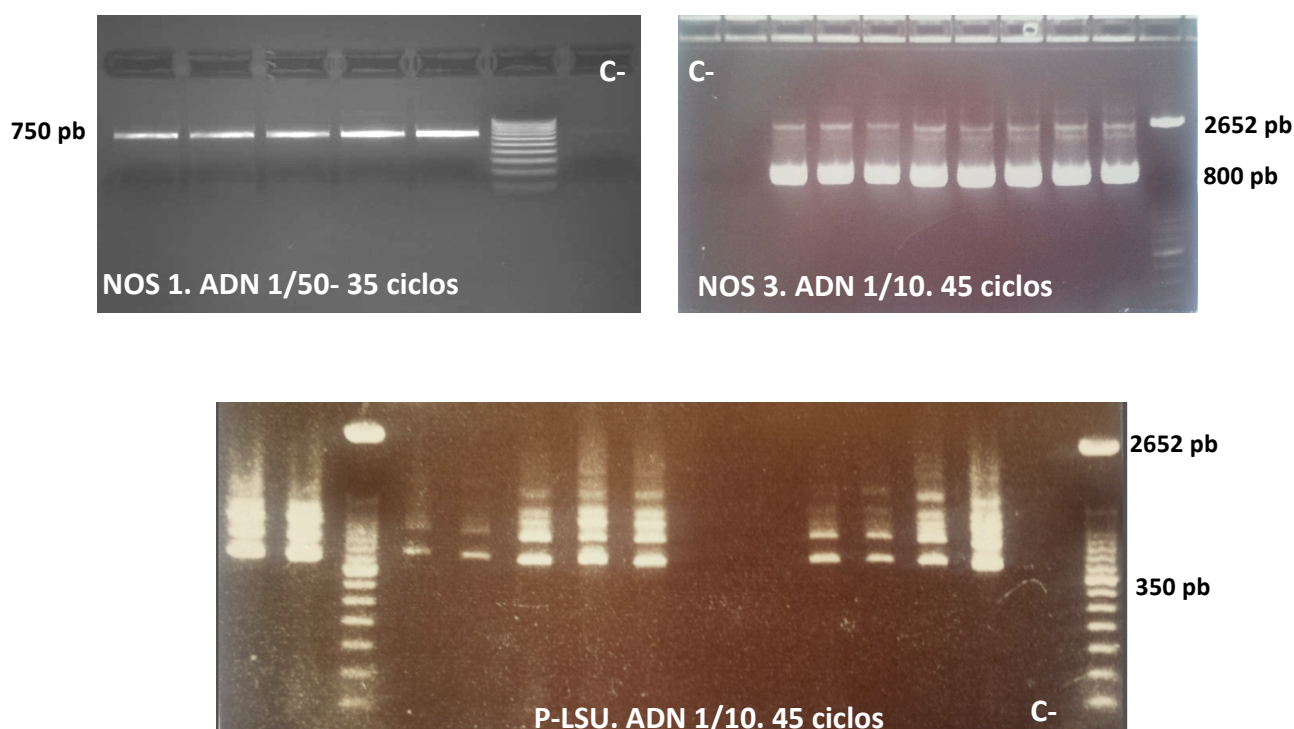


Figura 2. Distintos genes de agarosa pertenecientes a productos de PCR NOS1, NOS3 y P-LSU. La electroforesis NOS1 muestra las bandas nítidas de unos 750 pb obtenidas en una PCR de 35 ciclos que partió de muestras de ADN diluidas 1/50. No se aprecian bandas inespecíficas. En el gel NOS3 las condiciones de PCR cambian para forzar una mayor eficacia de amplificación, 45 ciclos y ADN inicial diluido 1/10. La banda esperada de 800 pb demuestra una mayor diana de PCR del fragmento esperado. Las bandas inespecíficas alrededor de los 2652 pb son más tenues, pero muy notables. El gel con los productos P-LSU evidencian una variedad de dianas de PCR de distintos tamaños entre los 400 pb y 1000 pb, aproximadamente.

Asimismo, los cromatogramas resultantes de la secuenciación directa de los productos purificados de NOS1 muestran varias secuencias superpuestas que impiden una lectura fiable de cada fragmento (fig. 3). Este hecho, junto con la aparición de las bandas inespecíficas en las electroforesis, hizo que se procediera al clonaje de todos los productos de PCR. En el caso de la amplificación de la SSU se sustituyeron los cebadores NOS1 y NOS2 por R3 y R2, respectivamente, ya que estos últimos abarcan zonas más amplias.

En este capítulo se analizan detalladamente dos zonas del rDNA de *N. ceranae*: por un lado el fragmento IGS-SSU-ITS, que está formado por los últimos 60 pb del 5S, el IGS, SSU e ITS completos, y las primeras bases de la LSU, mediante los cebadores NOS3, R3 y R2. Por otro lado, el fragmento LSU-PLSU incluye las últimas 1005 pb de la LSU y el fragmento no codificante adyacente mediante los cebadores NOS4 y P-LSU, respectivamente.

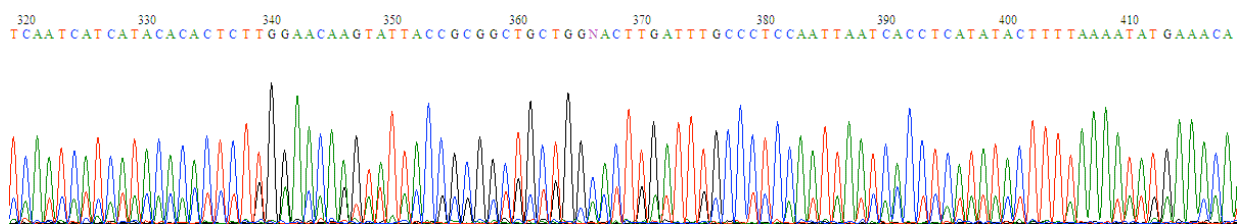


Figura 3. Cromatograma correspondiente a un fragmento de PCR NOS1, amplificado y secuenciado directamente, donde se observa un solapamiento de secuencias que impide una lectura fiable.

Análisis de la unidad 5S

Las parejas de cebadores NOS3 y R3 diseñadas en este trabajo únicamente aportan información sobre los últimos 60 pb de la unidad 5S (apéndice I). Son 57 los

clones que incluyen esta zona en su secuencia y sólo un *singleton* aparece en uno de ellos (1 mutación entre 3420 pb). Por su naturaleza conservada esta zona puede ser de especial interés a la hora de diseñar cebadores.

Análisis del IGS

El espaciador intergénico muestra una altísima variabilidad tanto en SNPs como indels a lo largo de sus 607 pb, número muy variable de unos clones a otros. Estos resultados no son de extrañar ya que se trata de una zona de ADN no codificante. El número de SNPs e indels es tan elevado que resulta muy complicado definir haplotipos a simple vista, y el diseño de experimentos de detección rápida de polimorfismos con fluorescencia, como la técnica de HRM (High Resolution Melting), resulta impensable. Por otro lado, llaman la atención las grandes diferencias entre clones del mismo aislado.

Por supuesto, se descarta como zona recomendable para el anillamiento de cebadores, y por este motivo, el amplicón R3, diseñado para complementar a NOS3, alberga también el IGS (fig. 1). Por el contrario, la variabilidad de esta zona ha motivado el estudio detallado que se incluye en el capítulo II.

Análisis de la unidad SSU

El gen de la subunidad pequeña del ribosoma alberga un grado de variabilidad sorprendente, primero por tratarse de un

gen, y segundo por su supuesta naturaleza conservada (Ueno y col., 2007). Aunque existe un cierto número de puntos polimórficos detectados en un solo caso (*singletons*) a partir de los cuales poco se puede inferir, otras mutaciones se repiten entre clones de distintos aislados (apéndice I). Igualmente, llama la atención la inserción-delección (indel) repetitiva del tetranucleótido GATT en la posición 118 del comienzo del gen, y que parece ser la causa más probable del solapamiento de secuencias en los cromatogramas NOS1 de producto de PCR sin clonar (fig. 3). Este indel se encuentra en una frecuencia notable (14 de 58 clones, que corresponde a un 24%, aproximadamente), lo cual sugiere la existencia de al menos dos copias diferentes de este gen por genoma. Estos resultados abrieron dos nuevas líneas de investigación, detalladas en los capítulos II y III de esta tesis. El resto de los indels encontrados son de una sola base y se localizan en zonas puntuales, normalmente ricas en nucleótidos Timina en tándem (zonas poli-T).

Por otro lado, el diseño de cebadores y sondas de ADN en esta unidad ha de hacerse con cautela ya que el anillamiento incompleto de alguno de ellos, particularmente de las sondas, podría falsear los resultados, sobre todo si

se trata de estudios enfocados a cuantificar cargas parasitarias en una colonia de abejas.

Análisis del ITS

Los resultados muestran muy poca variabilidad a lo largo de los 38 pb del ITS de *N. ceranae*: un *singleton* en 16 clones, que corresponde a 1 mutación en 608 pb (0.16%), y una transición C-T en 3 clones, que no resulta ser de utilidad a la hora de diferenciar cepas ya que no se repite entre clones del mismo aislado (apéndice I). Esto hace pensar que esas 38 pb contienen secuencias de reconocimiento para el procesamiento de los rRNA, lo cual implica que sean mínimas las posibilidades para albergar mutaciones. Por tanto, el ITS de *N. ceranae* parece ser de naturaleza mucho más conservada de lo que en principio se suponía. Esta característica convierte este pequeño fragmento en un buen marcador para diferenciar especies, pero poco interesante a la hora de buscar diferencias intraespecíficas en *N. ceranae*.

Análisis de la unidad LSU

Las primeras 148 pb de la LSU amplificadas con R2 muestran 2 SNPs parsimónicos y 3 *singletons*, panorama parecido a varias

zonas de la SSU (apéndice I). Igualmente, el estudio de las últimas 1005 pb del gen muestran 19 *singletons*, 6 SNPs parsimónicos y un indel (apéndice II), pero con la diferencia de un mayor número de dominios conservados frente a la SSU. Esto hace que, con cautela, esta zona pueda ser de elección para ciertos experimentos de PCR cuantitativa, o PCRs de diferenciación de especies, pero no parece ser muy llamativa a la hora de diferenciar posibles cepas en *N. ceranae*. La zona final de la LSU alberga mayor grado de variabilidad, muy parecido a su vez a la zona inmediatamente adyacente.

El final del gen está descrito como “supuesta terminación” en la secuencia DQ486027, lo que hace sospechar sobre la existencia de un pequeño margen de error de unas pocas pares de bases en la determinación de este punto.

Análisis del espaciador adyacente a la LSU

Esta zona es, sin duda, la más complicada de analizar y se detalla en el apéndice II. Ya en las electroforesis del producto de PCR P-LSU aparecían varias bandas de tamaños diferentes de manera sistemática

(fig. 2), y tras clonar dichos productos, los resultados revelan un amplicón cuyos flancos son similares entre todas las secuencias, pero existe una zona central donde se insertan fragmentos de ADN de tamaño y secuencia muy diferentes (fig. 4). Precisamente esta diferencia de tamaño de los insertos es la responsable de las distintas bandas de la electroforesis inicial, y las grandes diferencias en sus secuencias hacen que los alineamientos carezcan de sentido.

Ninguno de los 48 clones obtenidos mostró una secuencia idéntica a la referencia DQ486027, es más, la zona media de inserción de esta secuencia no se encontró representada en ninguno de los clones analizados. Es por esto que el alineamiento completo no se pudo realizar tomando como referencia la secuencia de *GenBank*, como se había llevado a cabo en todos los resultados anteriores. La secuencia DQ486027 posee, a partir de su base número 3943, un segmento de 92

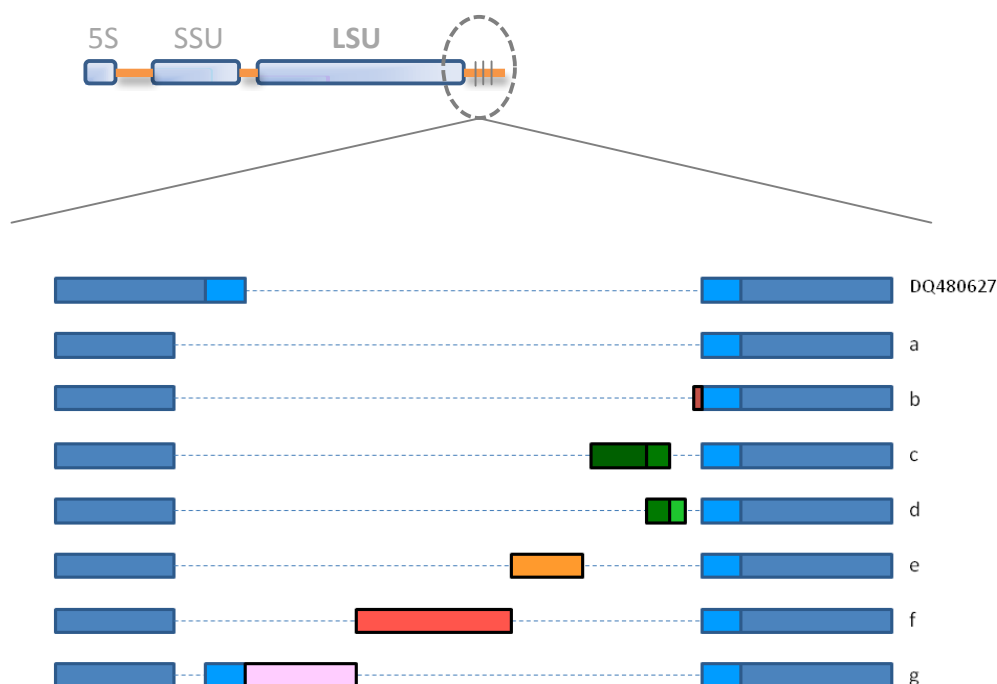


Figura 4. Esquema de los resultados obtenidos sobre la zona adyacente a la LSU. Los fragmentos en color azul oscuro representan similitud entre los clones obtenidos. Los fragmentos representados en color azul claro corresponden a la repetición de 92 pb, presente dos veces en DQ486027. Las zonas en verde, naranja, rojo y rosa corresponden con insertos de secuencia discordante. Los distintos grupos de secuencias señalados están compuestos por: **a)** 816-3-PLSU, 816-6-PLSU, 889-7-C, 853-2-PLSU, 853-7-PLSU, 816-5-PLSU, 889-8-PLSU, 816-13-PLSU, 816-7-C, 816-3-C, 853-6-PLSU, 889-5-PLSU, 853-8-C, 853-6-C, 853-2-C, 816-9-PLSU, 853-11-PLSU, 853-5-PLSU, 816-2-PLSU, 889-3-PLSU, 889-6-PLSU, 889-4-C, 853-1-PLSU, 853-8-PLSU, 816-7-PLSU, 816-10-PLSU, 889-2-PLSU, 816-1-PLSU ; **b)** 816-5-C, 816-2-C, 853-10-C; **c)** 889-3-C, 889-5-C, 889-2-C; **d)** 853-3-PLSU, 816-4-C, 816-4-PLSU, 889-7-PLSU, 816-14-PLSU, 816-12-PLSU, 853-12-PLSU, 816-8-PLSU, 889-6-C, 889-10-C, 889-9-C; **e)** 816-11; **f)** 853-4; **g)** 889-4.

nucleótidos repetido en tándem. El primer bloque de repetición coincide con la región media del amplicón ya comentada, donde una serie de inserciones y deleciones crean las profundas diferencias entre clones. El segundo bloque repetido en tándem de DQ486027 es común para todas las secuencias, y forma parte del flanco final del amplicón (fig. 4). Estas zonas flanqueantes sí guardan parecido entre clones y DQ486027, con sustituciones ocasionales e indels puntuales que hacen que la situación sea parecida a la del IGS, como era de esperar en una zona no codificante.

Al analizar las inserciones de la zona media de los 48 clones frente a la referencia de *GenBank*, se observa que la mayoría de las secuencias no poseen inserción, o lo que es lo mismo, poseen una deleción que correspondería al primer bloque de 92 pb repetido en tándem en DQ486027. Los restantes, además de esta deleción, incluyen inserciones de tamaños variables.

Para las inserciones de menor tamaño, es imposible una aproximación fidedigna al estudio de su procedencia. No obstante, para los clones con inserciones de mayor tamaño, como son 816-11, 853-

4 y 889-4, su origen en algún gen queda evidenciado por corresponder las secuencias nucleotídicas con patrones coherentes de secuencias de aminoácidos. Así, la inserción presente en 889-4 codificaría para la cadena de 93 aminoácidos:

RSQCIYHAQE	NLAMLGSAKR
KKKGEVESCE	IGVDLSTSGV
QESAKALVLE	GIKPVSEVCS
YRRVTIHDDQ	ELNDSWSKNV
SLFERISKED	GSIA

que, sin embargo, no muestra coincidencias significativas utilizando BLASTP.

Por su parte, el clon 816-11 posee una inserción de 140 pb cuya secuencia no tiene tampoco coincidencias en el BLAST, ni siquiera relajando los parámetros de búsqueda; su secuencia reversa complementaria codifica para una cadena de 47 aminoácidos, igualmente sin coincidencias significativas en el BLASTP:

YWYHFTHIDL	SWYNRFVPNG
PNSYPQSLSR	FRFWFFLHRY
YLQDRGR	

Por último, el clon 853-4 posee una inserción de 432 pb sin coincidencias con cualquiera de las anteriores, pero 331 pb de su secuencia guardan un 99% de identidad con el gen de una proteína hipotética del genoma de *N. ceranae*, XM_002994811.

Discusión

El rDNA de *N. ceranae* es un marcador que ha de utilizarse con cautela la hora de diseñar experimentos basándose en sus secuencias. Los fragmentos no codificantes son muy variables y los clones de un mismo aislado no guardan una concordancia visible entre ellos, de modo que estas zonas no ofrecen una buena alternativa como marcadores intraespecíficos a la hora de distinguir cepas en *N. ceranae*. En particular, la variabilidad del fragmento R3 (IGS-SSU) precisa de un análisis más exhaustivo (capítulo II) y la variabilidad inusual del gen de la SSU abre una incógnita sobre las posibles variantes de rRNA activas en *N. ceranae* (capítulo III). Igualmente, el grado de variabilidad notable del gen de la SSU lo descarta como un marcador de elección para experimentos de *q*-PCR con sondas

de ADN, además de precisar un análisis exhaustivo de cada zona antes del diseño de PCRs. Por otro lado, el gen de las LSU parece albergar mayor número de dominios conservados, asegurando una mayor fiabilidad en experimentos de *q*-PCR, pero igualmente es necesario estudiar bien las zonas diana a la hora de diseñar nuevos experimentos. Por último, el fragmento adyacente a la LSU parece ser una zona en la que suceden frecuentes reordenaciones, donde la variabilidad de las zonas flanqueantes comunes es elevada y la naturaleza de las inserciones, caótica. Además de deleciones y pequeñas inserciones de origen imposible de determinar, también existen ciertas inserciones de segmentos génicos. Entre estas últimas, sólo una pudo identificarse con una supuesta proteína exclusiva de *N. ceranae*, mientras que en el resto de los casos la procedencia de cada inserto no pudo precisarse con exactitud. El hecho de que existan zonas en el genoma de este microsporidio donde ocurran reinserciones de material genético, bien propio, bien ajeno, no resulta extraño teniendo en cuenta la capacidad de los microsporidios de ampliar su genoma con material genético de su hospedador (Selman y Corradi, 2011). Particularmente

en el género *Nosema* se han descrito especies que han incorporado a sus respectivos genomas genes de sus hospedadores que les confieren mayor protección celular (Fast y col., 2003; Corradi y col., 2009; Xiang y col., 2010). Sea como fuere, la naturaleza de este fragmento hace que el diseño de cualquier experimento deba sopesarse, evitando el anillamiento de cebadores y sondas a lo largo de las zonas ricas en SNPs, y en particular, en la zona media de la misma.

El análisis del rDNA a través de los 145 clones obtenidos en este estudio demuestra unos genes ribosómicos heterogéneos. El hecho de que *N. ceranae* rompa con la regla de la uniformidad en el rDNA, propuesta por Ueno y colaboradores en el año 2007, abre una primera cuestión sobre por qué los procesos de evolución concertada no están trabajando para homogeneizar las distintas copias de rDNA en esta especie. Según Ironside (2013), las copias dispuestas en tándem son más

susceptibles de homogenización ya que los procesos involucrados en ello, como son la conversión génica y los sobrecruzamientos desiguales, trabajan mejor sobre cromosomas homólogos que sobre heterólogos (Goldman y Lichten, 1996). La disposición del rDNA a lo largo del genoma *N. ceranae* es una cuestión aún sin resolver, pero el hecho de que una PCR diseñada para una amplificación optimizada produzca 4 bandas inespecíficas de mayor tamaño de manera sistemática (fig. 2), sin obtener secuencias inesperadas en los correspondientes clones, hace pensar en la existencia de al menos 4 copias en tándem por genoma, pero sin la certeza de descartar copias dispersas. De manera que el hecho de encontrar un número notable de variantes en estos genes deja claro que los procesos de evolución concertada no están actuando en *N. ceranae*. Este tema se abordará en cada uno de los siguientes capítulos en mayor profundidad.

Bibliografía

- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G., 2009. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 53-58.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Ridan, D., Pettis, J.S., 2009a. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal Eukaryotic Microbiology* 56:142-147.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S., 2009b. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in Honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 204-209.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., Evans, J.D., 2009. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. *PLoS Pathogens* 5(6): 1–14.
- Dover, G., Coen, E., 1981. Spring-Cleaning Ribosomal DNA - a Model for Multigene Evolution. *Nature* 290: 731–732.
- Gatehouse, H.S., Malone, L.A., 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:97-105.
- Goldman, A.S.H., Lichten, M., 1996. The efficiency of meiotic recombination between dispersed sequences in *Saccharomyces cerevisiae* depends upon their chromosomal location. *Genetics* 144: 43–55.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Huang, W.F., Tsai, S.J., Lo, C.F., Soichi, Y., Wang, C.H., 2004. The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 473–481.

- Huang, W.F., Bocquet, M., Lee, K.C., Sung, I.H., Jiang, J.H., et al., 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 9–13.
- Ironside, J.E., 2007. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evolutionary Biology* 7:48
- Ironside, J.E., 2013. Diversity and recombination of disperse ribosomal DNA and protein coding genes in microsporidia. *PLoS ONE* 8(2):e55878.
- Keeling, P., 2009. Five questions about Microsporidia. *PLoS Pathogens* 5(9): e1000489.
Doi:10.1371/journal.ppat.1000489.
- Li, J.L., Chen, W, Wu, J., Peng, W.J., An, J., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., 2012. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus spp.*) from China. *International Journal for Parasitology* 42: 49–61.
- Liu, H.D., Pan, G.Q., Song, S.H., Xu, J.S., Li, T., Deng, Y., Zhou, Z., 2008. Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99:235-238.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6331-6338.
- Michalczyk, M., Sokół, R., Szczerba-Turek, A., 2013. Phylogenetic analysis of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* small subunit 16S rRNA in honey bees (*Apis mellifera*) from north-easter Poland. *Medycyna weterynaryjna* 69(12): 733-735.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39, 121-152.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T., Paxton, R.J., 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54:103-109.
- Sak, B., Kvac, M., Petrzalkova, K., Kvetonova, D., Pomajbikova, K., Mulama, M., Kiyang, J., Modrý, D., 2011. Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitologica* 58: 81–86.

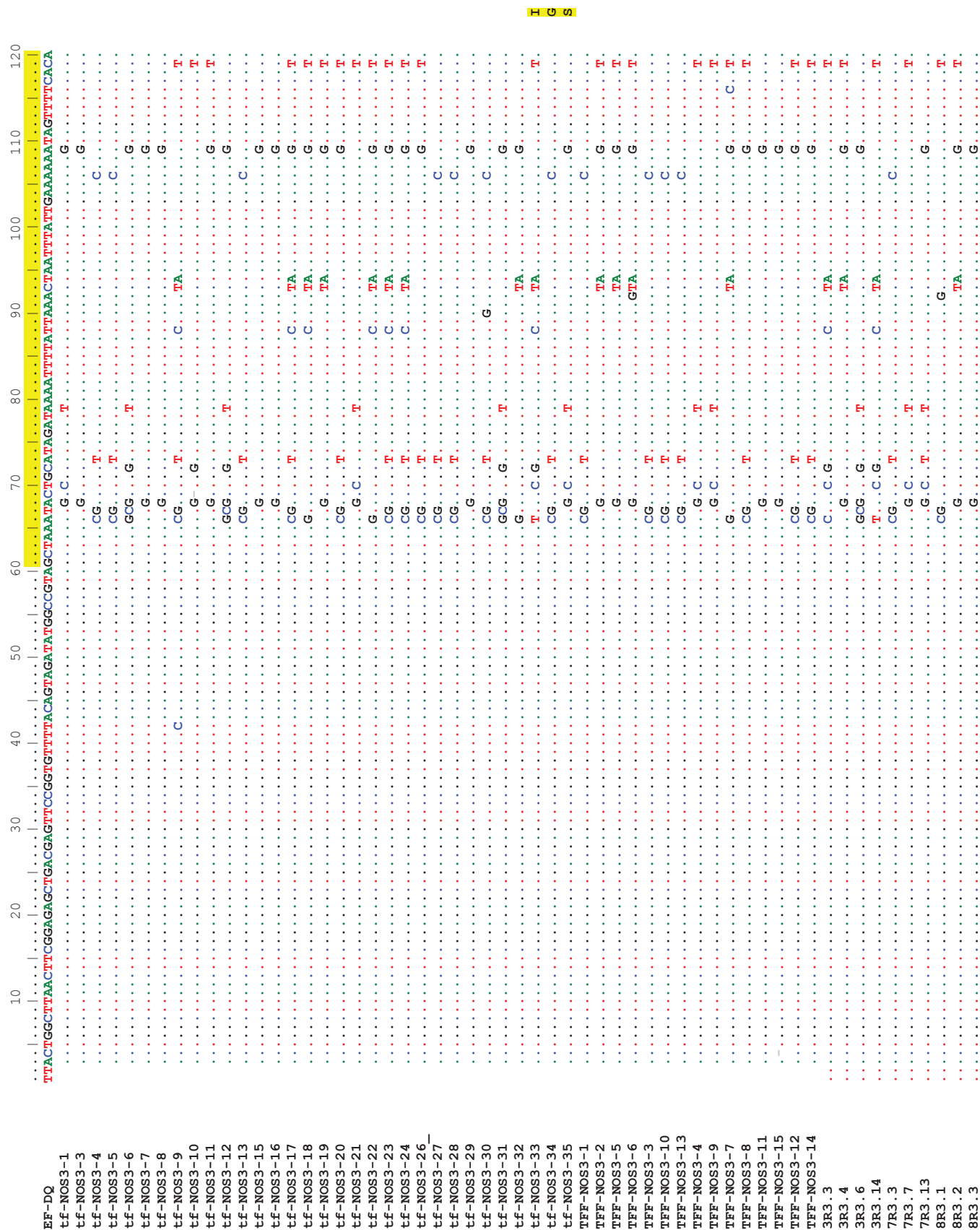
- Santin, M., Fayer, R., 2009. *Enterocytozoon bieneusi* Genotype Nomenclature Based on the Internal Transcribed Spacer Sequence: A Consensus. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 34–38.
- Schoch, C.I., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Sponge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., *et al.* (Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List), 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109:6241-6246.
- Tay, W.T., O'Mahony, E.M., Paxton, R.J., 2005. Complete rRNA gene sequence reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus spp.*) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 505–513.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Ueno, R., Huss, V.A., Urano, N., Watabe, S., 2007. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single *Prototheca* strain. *Microbiology* 153:3879-3893.
- Wilkinson, T.J., Rock, J., Whiteley, N.M., Ovcharenko, M.O., Ironside, J.E., 2011. Genetic diversity of the feminising microsporidian parasite *Dictyocoela*: New insights into host-specificity, sex and phylogeography. *International Journal for Parasitology* 41: 959–966.

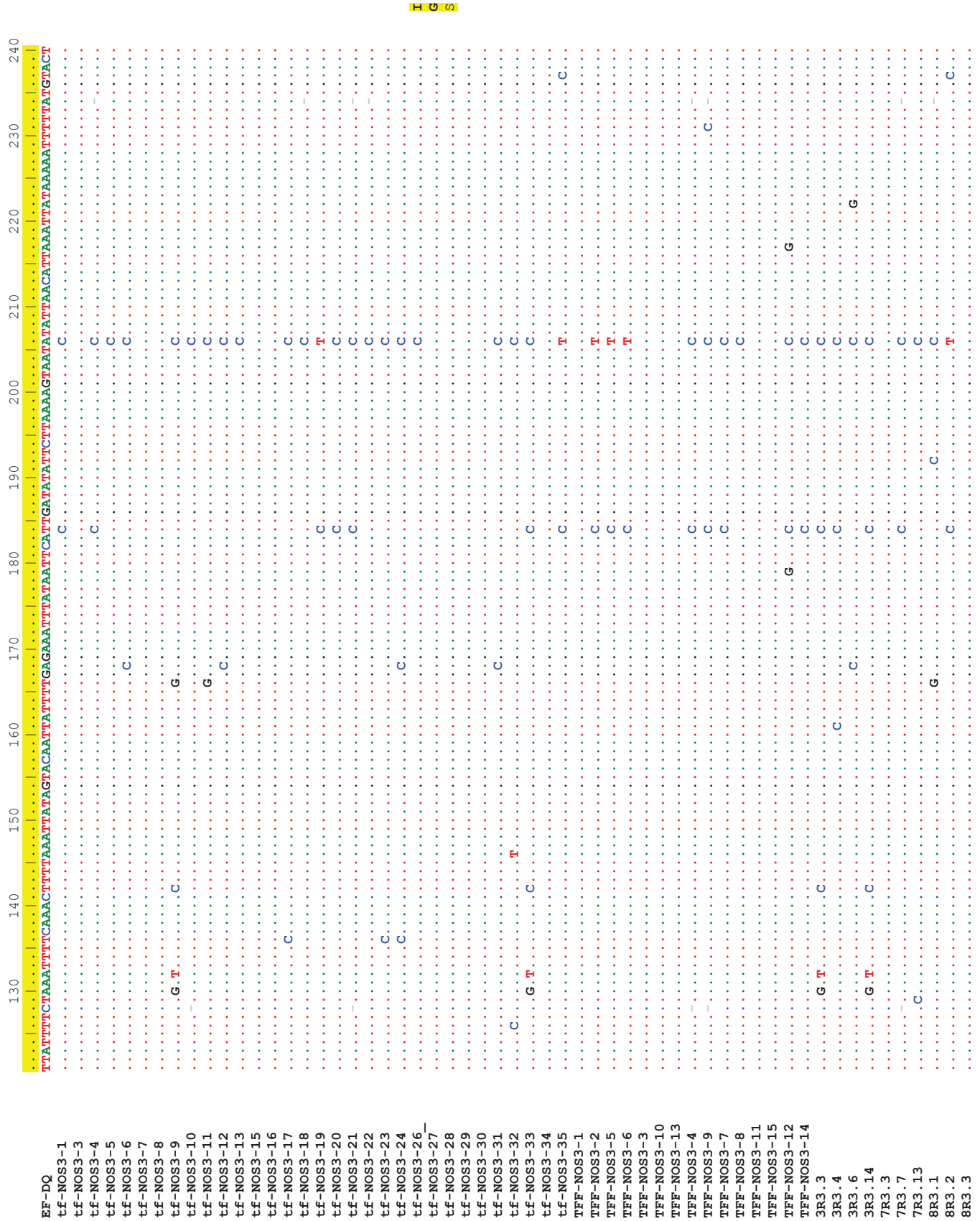
Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Apéndice I

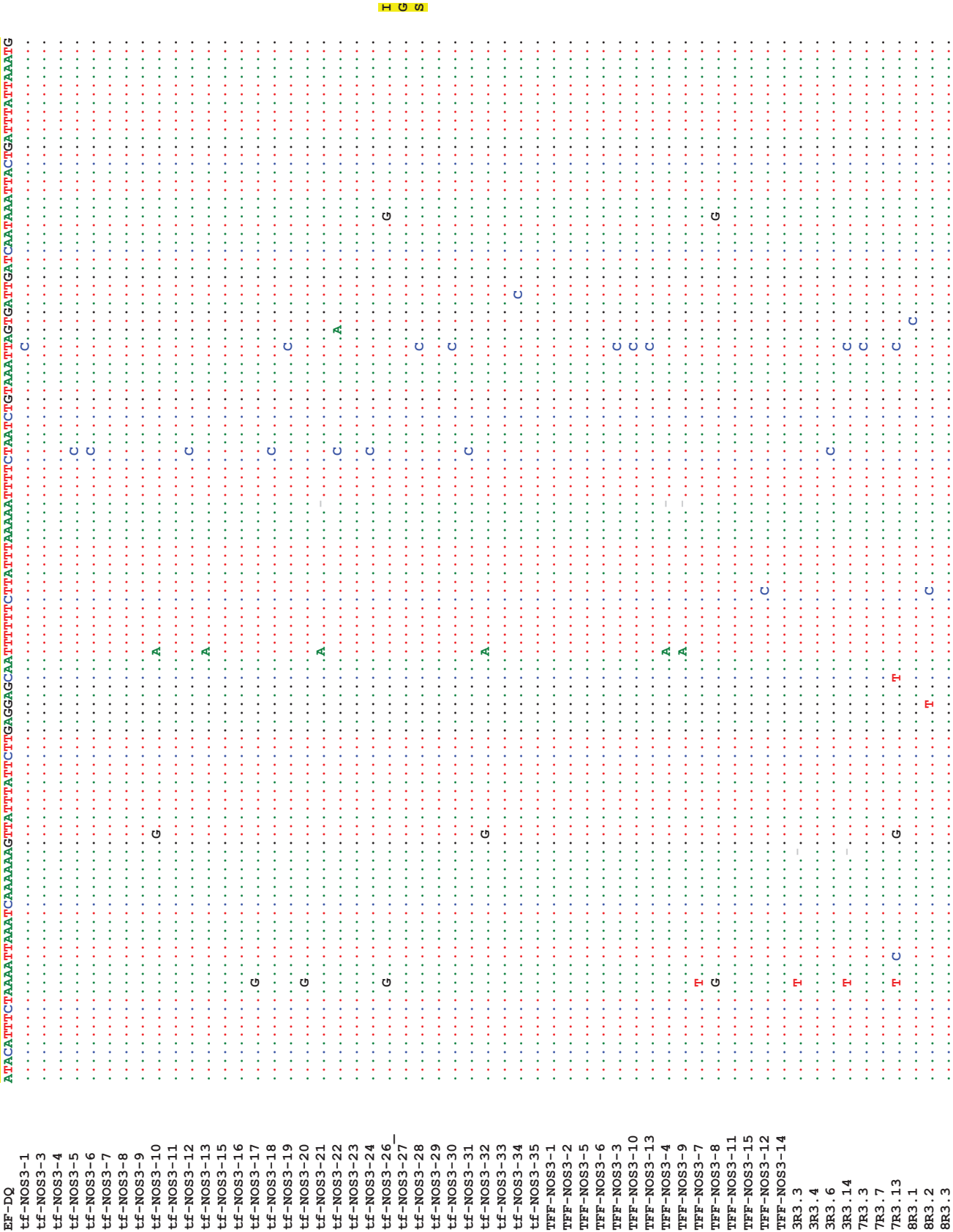
Alineamiento completo de los clones que corresponden a las zonas del IGS, SSU e ITS frente a las secuencias de referencia de *GenBank* EF091880 y DQ486027.



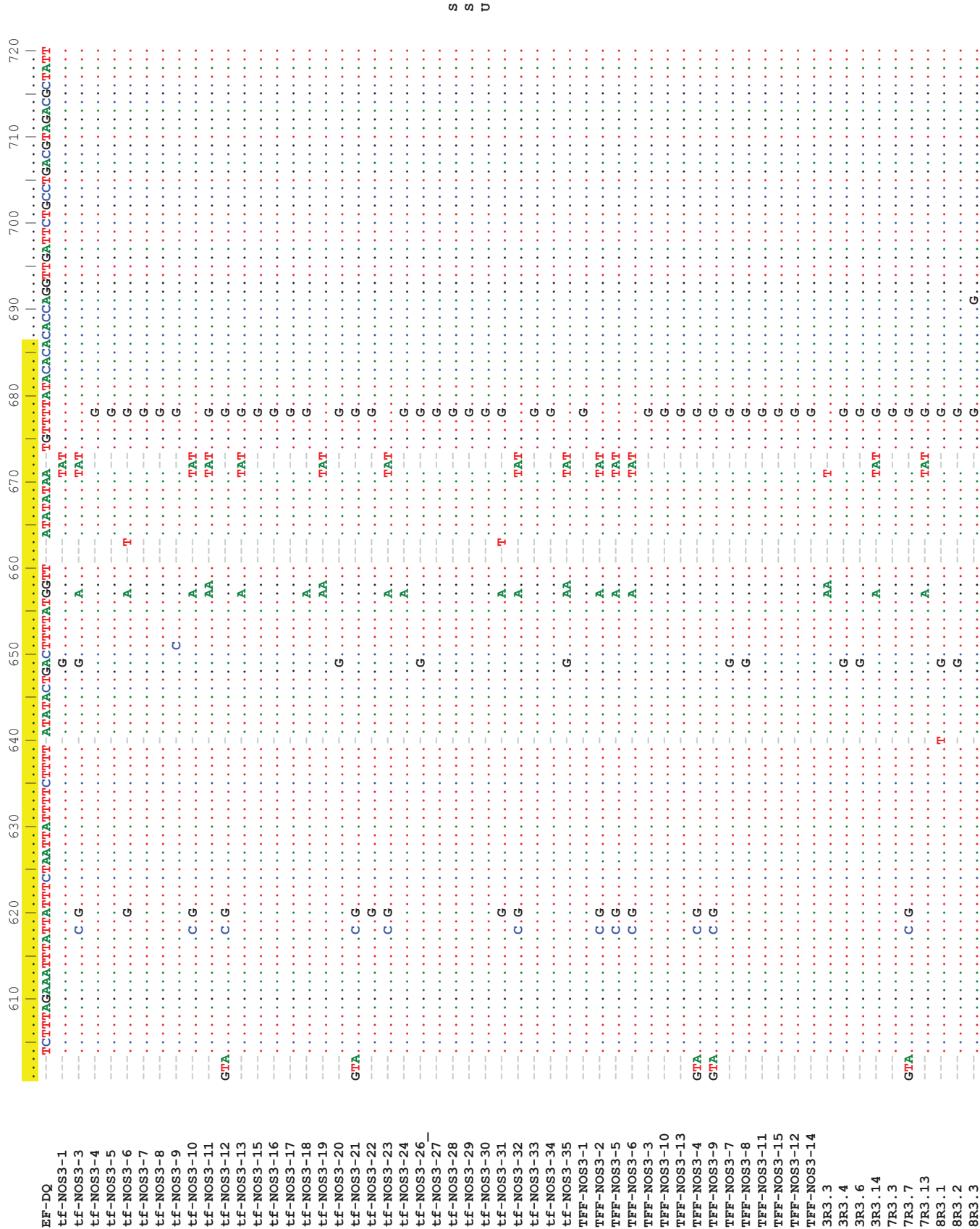


	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
EF-DQ	TTGTAATTACA	TTATAACACGATAAAAA	TAATAAATACAC	TTTTGTATCTATTTAGATTTATATAAATAAACATTA	AA	TTGACTCTCTTTTAA	TTGTTACTAA	TTTAAAGCCCATATATAT				
tf-NOS3-1												
tf-NOS3-3												
tf-NOS3-4												
tf-NOS3-5												
tf-NOS3-6												
tf-NOS3-7												
tf-NOS3-8												
tf-NOS3-9												
tf-NOS3-10												
tf-NOS3-11												
tf-NOS3-12												
tf-NOS3-13												
tf-NOS3-15												
tf-NOS3-16												
tf-NOS3-17												
tf-NOS3-18												
tf-NOS3-19												
tf-NOS3-20												
tf-NOS3-21												
tf-NOS3-22												
tf-NOS3-23												
tf-NOS3-24												
tf-NOS3-26_												
tf-NOS3-27												
tf-NOS3-28												
tf-NOS3-29												
tf-NOS3-30												
tf-NOS3-31												
tf-NOS3-32												
tf-NOS3-33												
tf-NOS3-34												
tf-NOS3-35												
TFF-NOS3-1												
TFF-NOS3-2												
TFF-NOS3-5												
TFF-NOS3-6												
TFF-NOS3-3												
TFF-NOS3-10												
TFF-NOS3-13												
TFF-NOS3-4												
TFF-NOS3-9												
TFF-NOS3-7												
TFF-NOS3-8												
TFF-NOS3-11												
TFF-NOS3-15												
TFF-NOS3-12												
TFF-NOS3-14												
3R3.3												
3R3.4												
3R3.6												
3R3.14												
7R3.3												
7R3.7												
7R3.13												
8R3.1												
8R3.2												
8R3.3												

H G S



185



[illegible]

ט ט ט

[illegible]

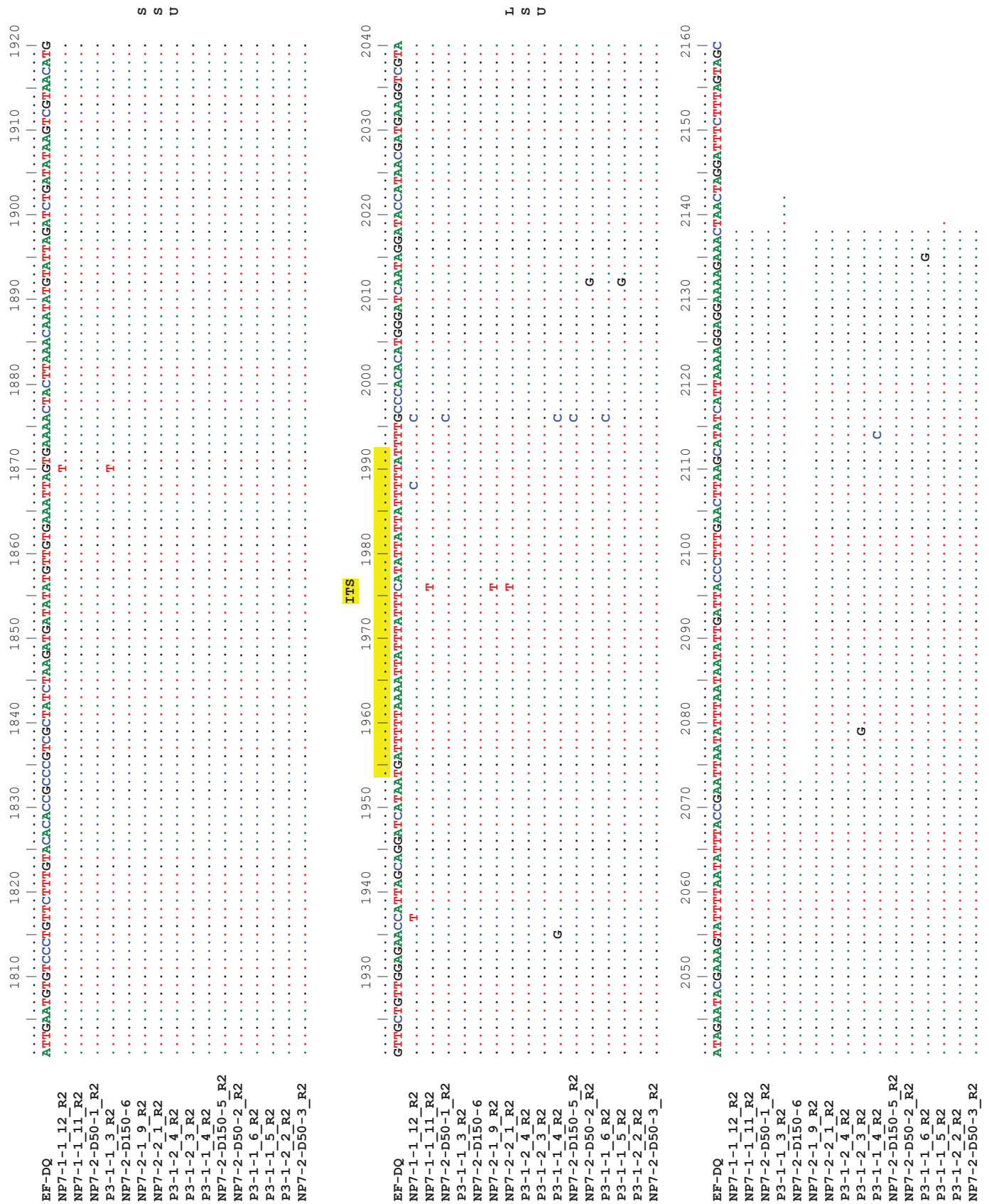
ט ט כ

Sequence logo for the 100bp region from 1090 to 1200 bp. The y-axis shows sequence logos for various motifs, and the x-axis shows the genomic position. The logo highlights conserved regions with red and green dots. Key motifs include EF-DQ, 3R3.3, 3R3.4, 3R3.6, 3R3.14, 7R3.3, 7R3.7, 7R3.13, 8R3.1, 8R3.2, 8R3.3, NP7-1-1_12_R2, NP7-1-1_11_R2, NP7-2-D50-1_R2, P3-1-1_3_R2, NP7-2-D150-6, NP7-2-1_9_R2, NP7-2-2_1_R2, P3-1-2_4_R2, P3-1-2_3_R2, P3-1-1_4_R2, NP7-2-D150-5_R2, NP7-2-D50-2_R2, P3-1-1_6_R2, P3-1-1_5_R2, P3-1-2_2_R2, and NP7-2-D50-3_R2. The logo shows a high degree of conservation in the 1100-1150 bp region, with a notable peak at 1130 bp.

ש ש ט

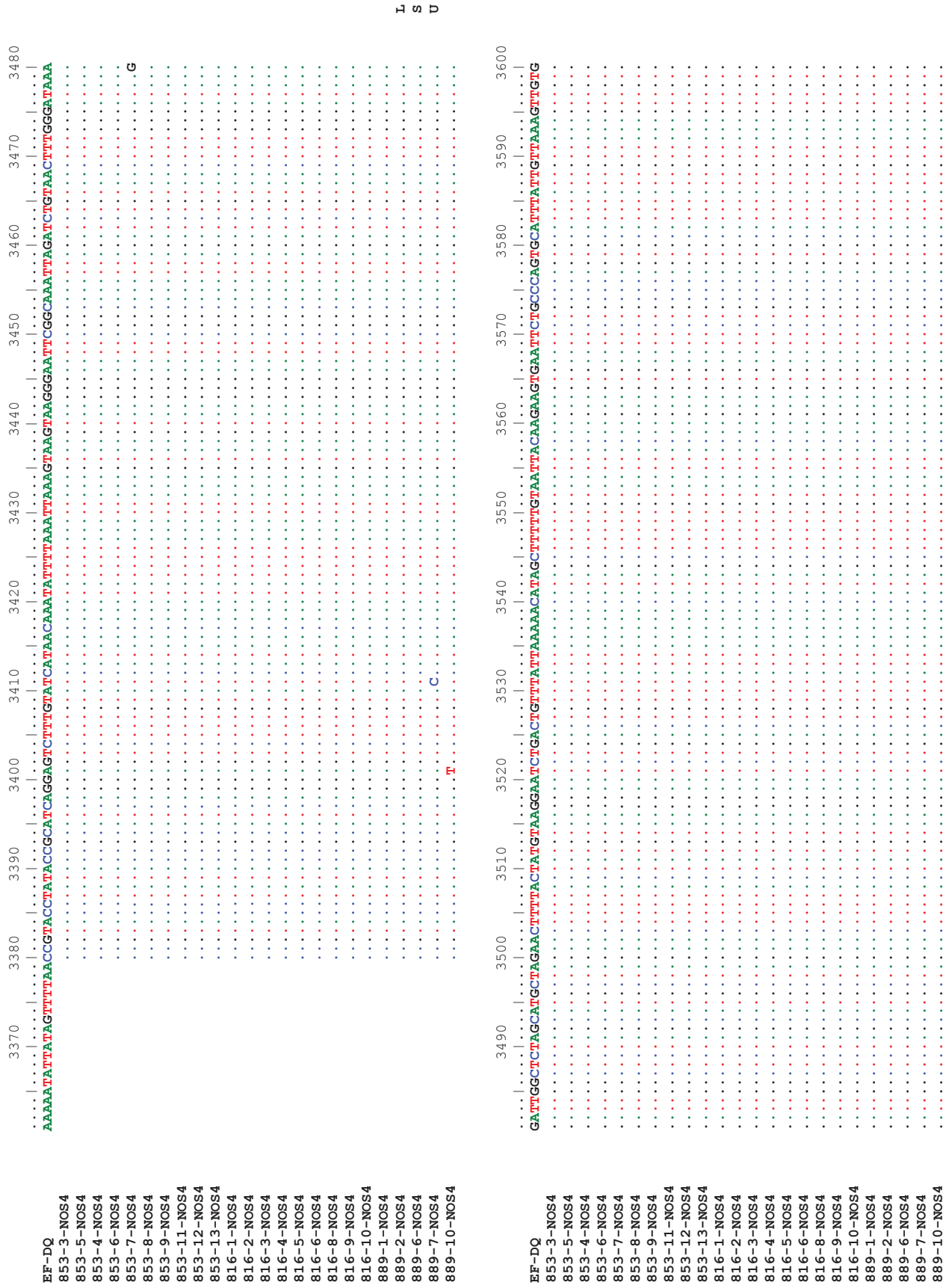
EF-DO

[illegible]



Apéndice II

Alineamiento completo de los clones que corresponden a las zonas del final de la LSU (1000 pb frente a la secuencia de referencia del GenBank DQ486027).



[illegible]

EF-DQ

853-3-NOS4
853-5-NOS4
853-4-NOS4
853-6-NOS4
853-7-NOS4
853-8-NOS4
853-9-NOS4
853-11-NOS4
853-12-NOS4
853-13-NOS4
816-1-NOS4
816-2-NOS4
816-3-NOS4
816-4-NOS4
816-5-NOS4
816-6-NOS4
816-8-NOS4
816-9-NOS4
816-10-NOS4
889-1-NOS4
889-2-NOS4
889-6-NOS4
889-7-NOS4
889-10-NOS4

TTGTGAACCACTATACAGGGAAACGGGCCTGTGTTATTTATTCAGCGGGGAAAGAACCCCTGTTGAGCTTCGCTTTAGTATGTTCTATAATATATTCGATATATTTGTAGAGGGTGGGAGA

3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840

[illegible]

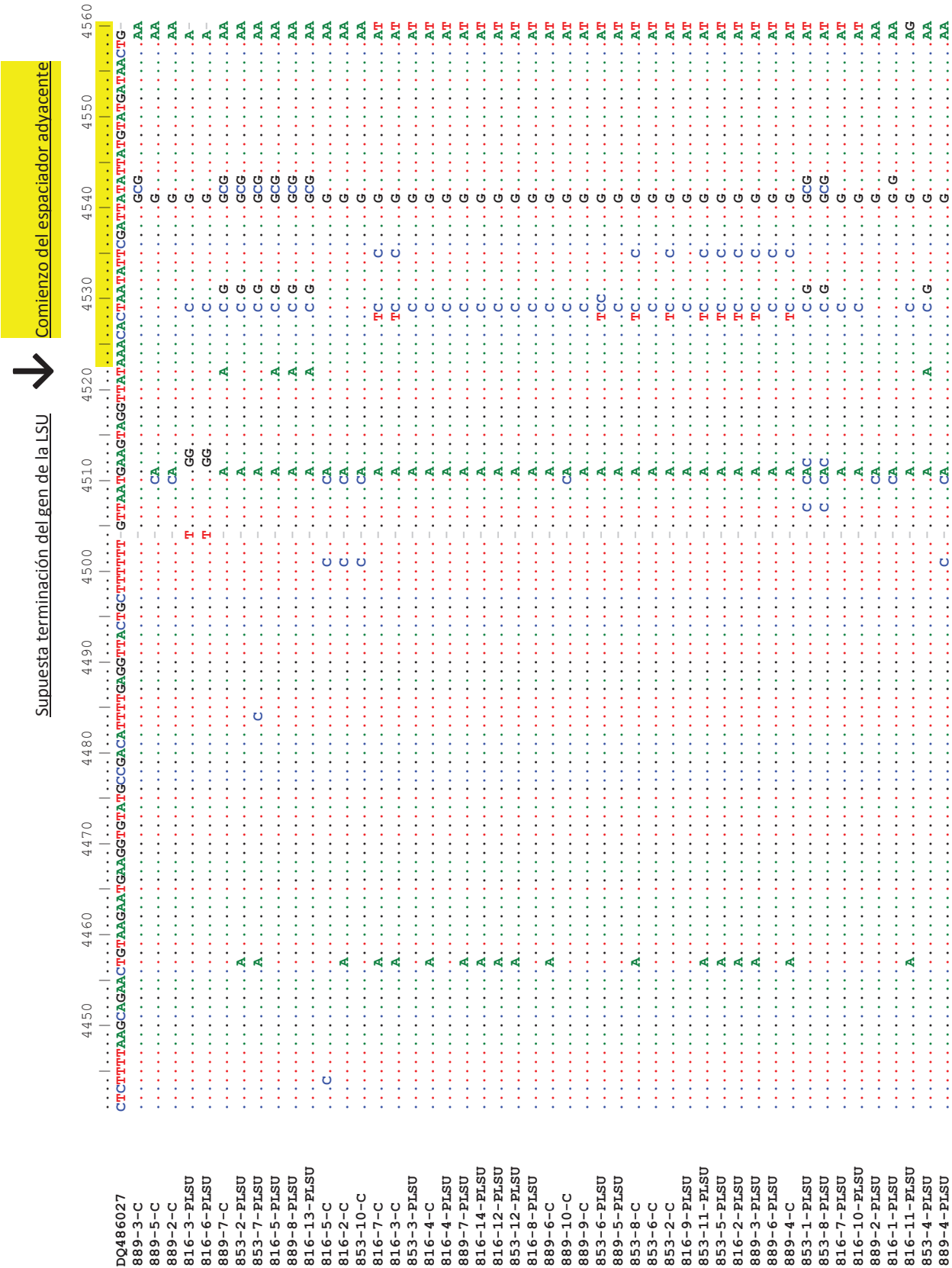
EFQ
 853-3-NOS4
 853-5-NOS4
 853-4-NOS4
 853-6-NOS4
 853-7-NOS4
 853-8-NOS4
 853-9-NOS4
 853-11-NOS4
 853-12-NOS4
 853-13-NOS4
 816-1-NOS4
 816-2-NOS4
 816-3-NOS4
 816-4-NOS4
 816-5-NOS4
 816-6-NOS4
 816-8-NOS4
 816-9-NOS4
 816-10-NOS4
 889-1-NOS4
 889-2-NOS4
 889-6-NOS4
 889-7-NOS4
 889-10-NOS4

[illegible]

H S D

Genomic tracks for the EF-DQ region (4210-4320 bp) showing 100% identity across various samples. The tracks are color-coded by sample group: 853-3-3-NOS4 (red), 853-5-NOS4 (blue), 853-4-NOS4 (green), 853-6-NOS4 (cyan), 853-7-NOS4 (magenta), 853-8-NOS4 (brown), 853-9-NOS4 (pink), 853-11-NOS4 (grey), 853-12-NOS4 (olive), 853-13-NOS4 (teal), 816-1-NOS4 (dark red), 816-2-NOS4 (dark blue), 816-3-NOS4 (dark green), 816-4-NOS4 (dark cyan), 816-5-NOS4 (dark magenta), 816-6-NOS4 (dark brown), 816-8-NOS4 (dark pink), 816-9-NOS4 (dark grey), 816-10-NOS4 (dark olive), 889-1-NOS4 (dark teal), 889-2-NOS4 (dark grey), 889-6-NOS4 (dark olive), 889-7-NOS4 (dark teal), and 889-10-NOS4 (dark grey). The reference sequence is shown at the top, and the identity percentage is 100% for all samples.

[illegible]

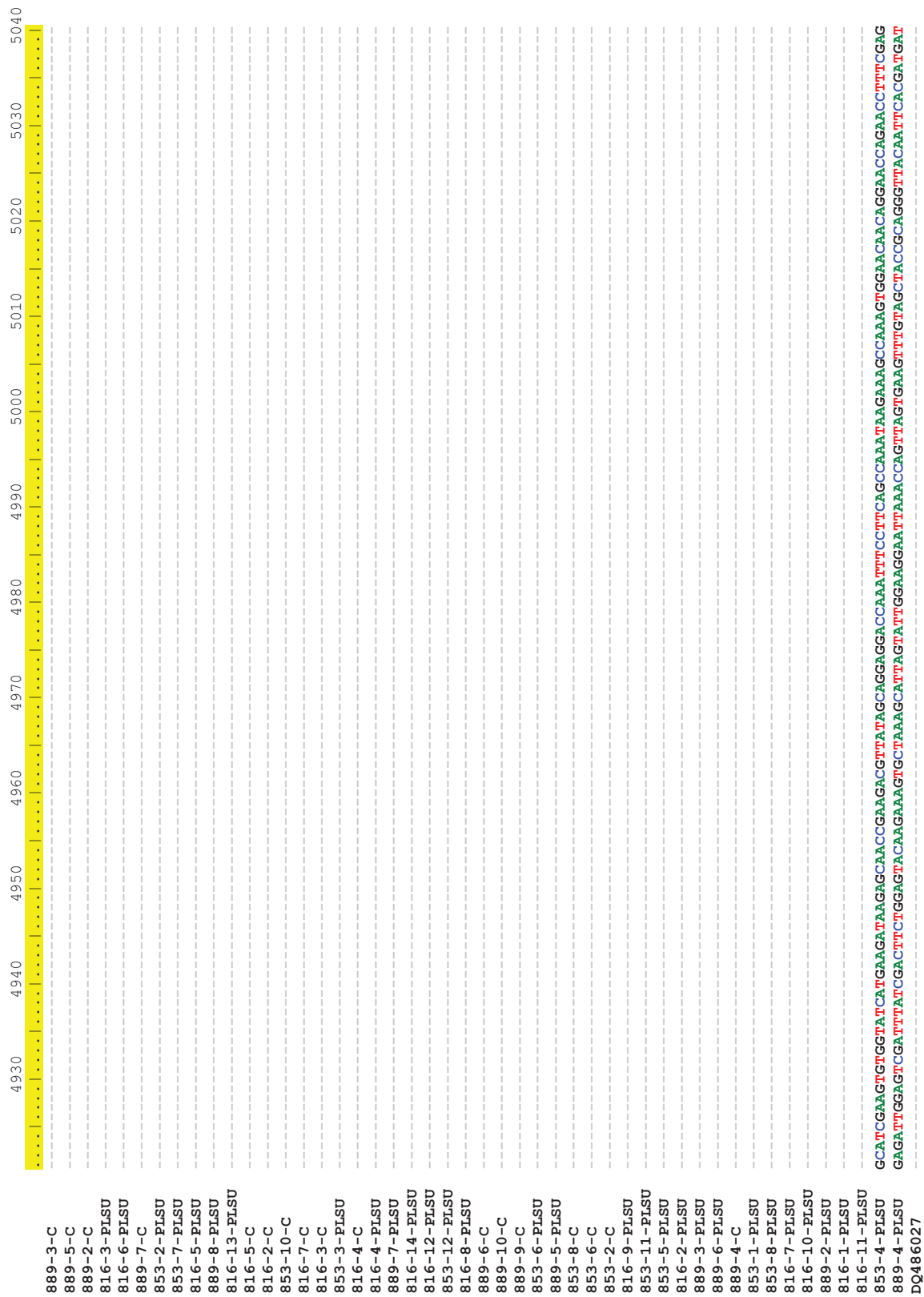


ESPACIADOR ADYACENTE P-LSU

	4570	4580	4590	4600	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680
889-3-C	GGGTAGAGCTTTTAC	TCC	TGGGAGAGGAGCTGGAA	GTG	TGTCCTCGTGGTTCTATAC	CGGGGTT	CGGAAAC	CTGTGTGCTTTATCG	ACCGAGCGGGT	CGGAC	CTTTTGTCTTAT	CCCGC
889-5-C
889-2-C
816-3-PLSU
816-6-PLSU
889-7-C
853-2-PLSU
816-5-PLSU
889-8-PLSU
816-13-PLSU
816-5-C
816-2-C
853-10-C
816-7-C	C..CTA
816-3-C	C..CTA
853-3-PLSU	C.C.G
816-4-C	C.C.G
816-4-PLSU	C.C.G
889-7-PLSU	C.C.G
816-14-PLSU	C.C.G
816-12-PLSU	C.C.G
853-12-PLSU	C.C.G
816-8-PLSU	C.C.G
889-6-C	C.C.G
889-10-C	C.C.G
889-9-C	C.C.G
853-6-PLSU	C..GCG..
889-5-PLSU	C.C.GT.A
853-8-C	C..CTA
853-6-C	C..CTA
853-2-C	C..CTA
816-9-PLSU	C.C.GT.A
853-11-PLSU	C..CTA
853-5-PLSU	C..CTA
816-2-PLSU	C..CTA
889-3-PLSU	C..CTA
889-6-PLSU	C..CTA
889-4-C	C..CTA
853-1-PLSU	C..GCC
853-8-PLSU	C..GCC
816-7-PLSU	C..GCC
816-10-PLSU	C..GCC
889-2-PLSU	...GCCTTT.CAC
816-1-PLSU	...GCCTTT.CAC
816-11-PLSU	..AA.C
853-4-PLSU
889-4-PLSU
DQ486027

Genomic alignment plot showing read coverage across a 100 bp region. The x-axis represents genomic position from 4690 to 4800 bp. The y-axis lists genomic features: 899-3-C, 899-5-C, 899-2-C, 816-3-PLSU, 816-6-PLSU, 899-7-C, 853-2-PLSU, 853-7-PLSU, 816-5-PLSU, 899-8-PLSU, 816-13-PLSU, 816-5-C, 816-2-C, 853-10-C, 816-7-C, 816-3-C, 853-3-PLSU, 816-4-C, 899-7-PLSU, 816-14-PLSU, 816-12-PLSU, 853-12-PLSU, 816-8-PLSU, 899-6-C, 899-10-C, 899-9-C, 853-6-PLSU, 853-8-C, 853-6-C, 853-2-C, 816-9-PLSU, 853-11-PLSU, 853-5-PLSU, 816-2-PLSU, 899-3-PLSU, 899-6-PLSU, 899-4-C, 853-1-PLSU, 853-8-PLSU, 816-7-PLSU, 816-10-PLSU, 899-2-PLSU, 816-1-PLSU, 816-11-PLSU, 853-4-PLSU, 899-4-PLSU, and D0486027. The plot shows a high density of reads (yellow bars) between 4730 and 4750 bp, with a notable peak at approximately 4740 bp. The reads are color-coded by source: red for T, blue for C, green for G, and yellow for A. The alignment is highly consistent across the features, with most reads showing a perfect match to the reference sequence.

	4810	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910	4920
889-3-C											
889-5-C	-----											
889-2-C	-----											
816-3-PLSU	-----											
816-6-PLSU	-----											
889-7-C	-----											
853-2-PLSU	-----											
853-7-PLSU	-----											
816-5-PLSU	-----											
889-8-PLSU	-----											
816-13-PLSU	-----											
816-5-C	-----											
816-2-C	-----											
853-10-C	-----											
816-7-C	-----											
816-3-C	-----											
853-3-PLSU	-----											
816-4-C	-----											
816-4-PLSU	-----											
889-7-PLSU	-----											
816-14-PLSU	-----											
816-12-PLSU	-----											
853-12-PLSU	-----											
816-8-PLSU	-----											
889-6-C	-----											
889-10-C	-----											
889-9-C	-----											
853-6-PLSU	-----											
889-5-PLSU	-----											
853-8-C	-----											
853-6-C	-----											
853-2-C	-----											
816-9-PLSU	-----											
853-11-PLSU	-----											
853-5-PLSU	-----											
816-2-PLSU	-----											
889-3-PLSU	-----											
889-6-PLSU	-----											
889-4-C	-----											
853-1-PLSU	-----											
853-8-PLSU	-----											
816-7-PLSU	-----											
816-10-PLSU	-----											
889-2-PLSU	-----											
816-1-PLSU	-----											
816-11-PLSU	-----											
853-4-PLSU	GCCGTTAATGGACTATTGTTCGCTGACGACCGGGTTGTATGGCAGAGAGTGAAATCCGCAATTGCGGAGGAACCTGGACCTGCTGACGAGTTGGAGTCAGAAAGCAGAGTGTTCAGTTAAT											
889-4-PLSU	CTGAGCTGCATAAGACGCCATAATTAGAAATGTAGCGATCTCAGTGTATATACCAATGCACAGGAGAACCTAGCAAATGTTGGGGTCCGCCAAAAGAAAAAAGGAGAGTTGAAAGCTGC											
DQ486027	-----											



[illegible]

	5170	5180	5190	5200	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280
889-3-C	GGGTTT	TAACTACCGGTGCGAA	TCTCATAAGTC	TTAAGCTTTACCAAT	TACCTTC	TGGCTGCTGGCAT	TGGTAA	GTAGGATCAGCGAT	TCCCTTGGGGT	TGAGTACCCCA	TTGCCGGAT	AAAAAGAGT
889-5-C												
889-2-C												
816-3-PLSU												
816-6-PLSU					C							
889-7-C					C							
853-2-PLSU												
853-7-PLSU												
816-5-PLSU												
889-8-PLSU												
816-13-PLSU												
816-5-C							A					
816-2-C					C							
853-10-C												
816-7-C												
816-3-C												
853-3-PLSU												
816-4-C												
816-4-PLSU												
889-7-PLSU												
816-14-PLSU												
816-12-PLSU												
853-12-PLSU												
816-8-PLSU												
889-6-C												
889-10-C												
889-9-C												
853-6-PLSU												
889-5-PLSU												
853-8-C												
853-6-C												
853-2-C												
816-9-PLSU												
853-11-PLSU												
853-5-PLSU												
816-2-PLSU												
889-3-PLSU												
889-6-PLSU												
889-4-C												
853-1-PLSU												
853-8-PLSU												
816-7-PLSU												
816-10-PLSU												
889-2-PLSU												
816-1-PLSU												
816-11-PLSU												
853-4-PLSU												
889-4-PLSU												
DQ486027												

Capítulo II

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Polimorfismo y recombinación en el rDNA del microsporidio supuestamente asexual *Nosema ceranae*, patógeno de abejas de la miel

Soledad Sagastume, Carmen del Águila, Raquel Martín-Hernández,
Mariano Higes y Nuno Henriques-Gil

Nosema ceranae es actualmente uno de los mayores patógenos de las abejas de la miel, relacionadas con el fenómeno de pérdida de colonias que está ocurriendo a lo largo de todo el mundo.

El genotipado de cepas basado en el ADN ribosómico (rDNA) puede llevar a conclusiones erróneas si las unidades de repetición no son idénticas. El análisis de fragmentos clonados del rDNA que albergan el espaciador intergénico (IGS) y parte del gen de la subunidad pequeña (SSU), de diferentes aislados de *N. ceranae* procedentes de distintas poblaciones de Europa y Asia central, revelan una alta diversidad de secuencias. La variabilidad encontrada se debe a polimorfismos de un solo nucleótido e inserciones/deleciones, y que resultan en 79 haplotipos. Dos secuencias del mismo aislado pueden ser tan diferentes como cualquier otro par de secuencias de muestras distintas; contrariamente, también se han encontrado haplotipos idénticos en muestras de orígenes geográficos muy diferentes. Consecuentemente, los haplotipos no se pueden organizar en un árbol filogenético consistente, lo cual indica claramente que el rDNA no es un marcador fiable para diferenciar cepas de *N. ceranae*.

Los resultados indican que la combinación entre secuencias diferentes puede producir nuevas variantes, hecho sorprendente en microsporidios a los que normalmente se ha considerado como organismos que tienen un modo de reproducción asexual. La diversidad de las secuencias y su distribución geográfica indica que los haplotipos de los distintos linajes pueden, ocasionalmente, estar presentes en una misma célula y sufrir recombinación homóloga, por tanto sugiriendo un ciclo sexual haplo-diploide.

Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees

Soledad Sagastume,¹ Carmen del Águila,¹
Raquel Martín-Hernández,² Mariano Higes² and
Nuno Henriques-Gil^{1*}

¹Universidad San Pablo-CEU, Biology Department,
28668 Montepríncipe, Spain.

²Centro Apícola Regional, Bee Pathology Laboratory,
19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain.

Summary

Nosema ceranae is currently one of the major pathogens of honeybees, related to the worldwide colony losses phenomenon. The genotyping of strains based on ribosomal DNA (rDNA) can be misleading if the repeated units are not identical. The analysis of cloned rDNA fragments containing the intergenic spacer (IGS) and part of the rDNA small-subunit (SSU) gene, from *N. ceranae* isolates from different European and Central Asia populations, revealed a high diversity of sequences. The variability involved single-nucleotide polymorphisms and insertion/deletions, resulting in 79 different haplotypes. Two sequences from the same isolate could be as different as any pair of sequences from different samples; in contrast, identical haplotypes were also found in very different geographical origins. Consequently, haplotypes cannot be organized in a consistent phylogenetic tree, clearly indicating that rDNA is not a reliable marker for the differentiation of *N. ceranae* strains. The results indicate that recombination between different sequences may produce new variants, which is quite surprising in microsporidia, usually considered to have an asexual mode of reproduction. The diversity of sequences and their geographical distribution indicate that haplotypes of different lineages may occasionally be present in a same cell and undergo homologue recombination, therefore suggesting a sexual haplo-diploid cycle.

Introduction

Microsporidia are a large and diverse group of eukaryotic organisms, consisting of more than 1200 species in 143 genera (Becnel and Andreadis, 1999; Wittner and Weiss, 1999). They are single-celled, spore-forming obligate intracellular parasites that belong to the phylum *Microsporidia* (Weiss, 2003). These organisms are true eukaryotes (they possess a typical eukaryotic nucleus, endomembrane system and cytoskeleton) but they also display molecular and cytological characteristics that were considered to be reminiscent of prokaryotes (Mathis, 2000). Recently, *Microsporidia* were reclassified from the protozoa to the *Fungi* cluster, in the new taxonomy of protists [*Opisthokonta:Fungi:Microsporidia*] (Adl *et al.*, 2005). These parasites are ubiquitous, exhibiting a very extensive range of hosts that includes almost all of the invertebrate phyla and all five classes of vertebrates (Canning and Lom, 1986; Mathis, 2000; Franzen and Müller, 2001; Weiss, 2003).

The genus *Nosema* contains more than 150 species, usually infecting invertebrate hosts, causing some well-known diseases such as pebrine disease in silkworms (by *Nosema bombycis*) and nosemosis, which is a common worldwide disease of adult honeybees, *Apis mellifera* (by *Nosema* spp.) (Becnel and Andreadis, 1999; OIE, 2008). *Nosema apis* infecting *A. mellifera* Linnaeus was described more than 100 years ago (Zander, 1909). Recently, a second microsporidian, *Nosema ceranae*, infecting the same host has been reported in Europe (Higes *et al.*, 2006), North America (Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008) and Taiwan (Huang *et al.*, 2008). This parasite species had previously been characterized only in naturally infected *Apis cerana* Fabricius honeybees (Fries *et al.*, 1996). These two microsporidia parasitize the epithelial cells of the ventriculus in *A. mellifera* (OIE, 2008). *Nosema ceranae* pathological repercussions are considered a major health problem in both individual honeybees (Paxton *et al.*, 2007; Antúñez *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2009a; Martín-Hernández *et al.*, 2009) and in whole colonies, producing honeybee colony collapse after an extended incubation period (Higes *et al.*, 2008) and have also recently been suggested as a key factor in colony losses in professional apiaries in Spain (Higes *et al.*, 2009b; 2010).

Received 23 April, 2010; accepted 14 June, 2010. *For correspondence. E-mail nhengil@ceu.es; Tel. (+34) 91 3724717; Fax (+34) 91 3510496.

The sequences of ribosomal DNA (rDNA) have been used to differentiate both species (Huang *et al.*, 2008; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008). Ribosomal DNA has also been used to analyse intraspecific variability in a number of species of microsporidia. For instance, different rDNA genotypes have been described in both *Encephalitozoon cuniculi* (Didier *et al.*, 1995) and *E. hellem* (Mathis *et al.*, 1999; Haro *et al.*, 2003), as well as *N. ceranae* (Huang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Ribosomal genes are repeated in all the genomes so far analysed: in *E. cuniculi* rDNA is located in the subtelomeric regions of the different chromosomes (Brugère *et al.*, 2000) and the existence of multiple tandemly arranged copies is also documented in species such as *N. apis* (Gatehouse and Malone, 1998). The overview after the genome project of *N. ceranae* indicates a picture concordant with *E. cuniculi* (Cornman *et al.*, 2009). Typically, rDNA is organized in tandemly repeated units, each one comprised of the small-subunit ribosomal unit gene (SSU), the internal transcribed spacer (ITS), the large-subunit gene (LSU) and an intergenic spacer (IGS). The position of the 5S RNA gene may vary from one species to another; in *N. ceranae* the 5S RNA gene is located downstream from the LSU gene, and is followed by the IGS (Huang *et al.*, 2008).

It is important to note that the characterization of species or strains after repeated sequence analysis assumes the identity of all the repeats. Indeed, ribosomal RNA genes are one of the best-known examples of concerted evolution (Nei and Rooney, 2005). Different mechanisms could be involved in the conservation of the uniformity of sequences between the different repeats. Eickbush and Eickbush (2007) showed that sister chromatid exchange (SCE) and, to a lesser extent, gene conversion in yeast could be the principal mechanisms responsible for such uniformity, although inter- and intra-chromosomal exchanges might also play a significant role. Obviously, in organisms without a haplo-diploid cycle, meiotic recombination should be discarded as a mechanism for concerted evolution. There are, however, some species where a fraction of the rDNA units have escaped the process of concerted evolution (Keller *et al.*, 2006); in flatworms selective pressure has been demonstrated to favour multiple rDNA sequences (Carranza *et al.*, 1999). Recent evidence has been provided that *Nosema bombi* possesses multiple rDNA variants in the same cell (Tay *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2007). Fries (2010) pointed out that this could be a common feature of microsporidia, which implies that phylogenetic inferences based on rDNA may be misleading. However, when certain fragments of the rDNA of *N. ceranae* are sequenced, overlapping sequences are systematically obtained (S. Sagastume, unpubl. results), indicating that the original source of DNA had two or more different

sequences. In order to define and analyse the inter- and intra-individual variation in the rDNA of *N. ceranae*, in this study we have cloned the polymerase chain reaction (PCR) products from isolates of different geographical origins. The heterogeneity of rDNA copies not only hinders the genetic characterization of isolates but also raises a number of relevant questions about the origins of the variability in microsporidia.

Results

The alignment of the 105 sequences revealed 0.65% singletons (77% transitions, 23% transversions and < 1% indels), randomly distributed along the IGS and SSU gene, supporting an origin in polymerase errors. PCR is known to produce occasional errors, and the frequency obtained here is compatible with other cases described in the literature (Clarke *et al.*, 2001; Acinas *et al.*, 2005). The singletons were corrected to the corresponding consensus nucleotides; that is, we considered only those differences appearing in at least two independent sequences. Table 1 shows the list of the 79 different sequences obtained (GenBank accessions GU131043 to GU131121), their corresponding haplotypes and the samples in which they were found.

The differences include a total of eight insertion/deletions (indels) – one ranged 42 base pairs (bp), two of 6 bp, one of 4 bp and four of 2 bp; occasional 1 bp indels were also detected – but most variability corresponds to single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (Table 2). A total of 159 polymorphic sites exist and 73 once gaps were excluded. As expected, when comparing a spacer with a coding segment, the variability of sequences was much higher in the IGS than in the SSU gene: for SNPs, nucleotide diversities were $\pi = 0.0259$ and $\pi = 0.0014$, respectively, and six indels occurred in the IGS while only two in the SSU gene. The level of polymorphism was similar in the different populations, which is remarkable given the different number of isolates and geographical origins.

As shown in Table 1, some clones of a given isolate revealed identical sequences; however, none of the isolates produced a unique haplotype. In fact, the haplotypes obtained from the same isolate are no more similar than any pair from a different origin. F_{ST} pairwise comparisons did not reveal any significant influence of the geographical origin of the samples, neither to that honeybee subspecies (*A. mellifera iberica* in Spain, *A. mellifera carnica* in Slovenia, and *A. mellifera mellifera* in Central Europe and part of Asia). In contrast, a number of identical haplotypes were obtained from very different sources. For instance, haplotype 18 emerged from one clone from Spain (isolate P3-1), another from Slovenia (SLO7) and still another from Kyrgyzstan (808). However, isolate P3-1 also produced the haplotypes 15–20, SLO7 haplotypes 66–68

Table 1. Haplotype list, GenBank accessions and their correspondent samples of origin.

GB accession	Haplotype	Sample	Country	GB accession	Haplotype	Sample	Country	GB accession	Haplotype	Sample	Country
GU131043	Hap 1	48-2	Spain	GU131066	Hap 24	NP7-2	Spain	GU131095	Hap 53	807	Slovakia
GU131044	Hap 2	48-2	Spain	GU131067	Hap 25	NP7-2	Spain	GU131096	Hap 54	807	Slovakia
GU131045	Hap 3	48-2	Spain			807	Slovakia	GU131097	Hap 55	807	Slovakia
GU131046	Hap 4	48-2	Spain			NP7-2	Spain	GU131098	Hap 56	807	Slovakia
GU131047	Hap 5	48-2	Spain	GU131068	Hap 26	NP7-1 (2)	Spain	GU131099	Hap 57	807	Slovakia
GU131048	Hap 6	48-2	Spain	GU131069	Hap 27	808 (2)	Kyrgyzstan	GU131100	Hap 58	807	Slovakia
GU131049	Hap 7	48-2	Spain	GU131070	Hap 28	808	Kyrgyzstan	GU131101	Hap 59	809	Kyrgyzstan
GU131050	Hap 8	48-2	Spain	GU131071	Hap 29	808	Kyrgyzstan	GU131102	Hap 60	809	Kyrgyzstan
GU131051	Hap 9	48-3 (2)	Spain	GU131072	Hap 30	808	Kyrgyzstan	GU131103	Hap 61	809 (2)	Kyrgyzstan
		NP7-2 (2)	Spain	GU131073	Hap 31	808	Kyrgyzstan	GU131104	Hap 62	809 (2)	Kyrgyzstan
		807	Slovakia	GU131074	Hap 32	808	Kyrgyzstan	GU131105	Hap 63	809	Kyrgyzstan
		809	Kyrgyzstan	GU131075	Hap 33	808	Kyrgyzstan	GU131106	Hap 64	809	Kyrgyzstan
GU131052	Hap 10	NB4-1	Spain	GU131076	Hap 34	808	Kyrgyzstan	GU131107	Hap 65	809	Kyrgyzstan
GU131053	Hap 11	NB4-2	Spain	GU131077	Hap 35	808	Kyrgyzstan	GU131108	Hap 66	SLO7	Slovenia
GU131054	Hap 12	NB4-3	Spain	GU131078	Hap 36	808	Kyrgyzstan	GU131109	Hap 67	SLO7	Slovenia
GU131055	Hap 13	P3-2 (4)	Spain	GU131079	Hap 37	808	Kyrgyzstan	GU131110	Hap 68	SLO7	Slovenia
GU131056	Hap 14	P3-2	Spain	GU131080	Hap 38	808	Kyrgyzstan	GU131111	Hap 69	953 (2)	Spain
GU131057	Hap 15	P3-1	Spain	GU131081	Hap 39	991	Germany	GU131112	Hap 70	953	Spain
GU131058	Hap 16	P3-1	Spain	GU131082	Hap 40	953	Spain	GU131113	Hap 71	953	Spain
GU131059	Hap 17	P3-1	Spain			991	Germany	GU131114	Hap 72	953	Spain
GU131060	Hap 18	P3-1	Spain	GU131083	Hap 41	991	Germany	GU131115	Hap 73	953	Spain
		808	Kyrgyzstan	GU131084	Hap 42	991	Germany	GU131116	Hap 74	1109	France
		SLO7	Slovenia	GU131085	Hap 43	991	Germany	GU131117	Hap 75	1109	France
GU131061	Hap 19	P3-1	Spain	GU131086	Hap 44	991 (2)	Germany	GU131118	Hap 76	1109	France
GU131062	Hap 20	NP7-2	Spain	GU131087	Hap 45	991	Germany	GU131119	Hap 77	1109	France
GU131063	Hap 21	NP7-2	Spain	GU131088	Hap 46	991	Germany	GU131120	Hap 78	1109	France
GU131064	Hap 22	NP7-2	Spain	GU131089	Hap 47	807	Slovakia	GU131121	Hap 79	1109	France
GU131065	Hap 23	NP7-2	Spain	GU131090	Hap 48	807	Slovakia				
		808	Slovakia	GU131091	Hap 49	807	Slovakia				
		807	Kyrgyzstan	GU131092	Hap 50	807	Slovakia				
		809 (2)	Kyrgyzstan	GU131093	Hap 51	807 (2)	Slovakia				
		1109	France	GU131094	Hap 52	807	Slovakia				
						809 (2)	Kyrgyzstan				

When the same haplotype was found in more than one clone the number of clones is indicated in brackets.

Table 2. Haplotypes of the rDNA fragment of *M. ceranae* showing only the polymorphic sites.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Hap_1	CAATATAGCTCTAATTATACCTACCGGATAATACACCTTTGTAT	TTATCTAATAGATTATATATAAACAATT	TCTACTTAATTTTATTTGTTG	TAAAGAT	TTGA	TTGATAATGAA	CACCAT	TACG	GG	A					
Hap_2	CTCAG	TC	T												
Hap_3	CTA	C	T												
Hap_4	CT	C	CTC	T											
Hap_5	CT	C	CTC	T											
Hap_6	CT	C	CTC	T											
Hap_7	CT	C	CTC	T											
Hap_8	CTCAG	TA	T												
Hap_9	CTCAG	TA	T												
Hap_10	CTCAG	TC	T												
Hap_11	CTCAG	TC	T												
Hap_12	CTCAG	TC	T												
Hap_13	CTCAG	TC	T												
Hap_14	CTCAG	TC	T												
Hap_15	CTCAG	TC	T												
Hap_16	CTCAG	TC	T												
Hap_17	CTCAG	TC	T												
Hap_18	CTCAG	TC	T												
Hap_19	CTCAG	TC	T												
Hap_20	CTCAG	TC	T												
Hap_21	CTCAG	TC	T												
Hap_22	CTCAG	TC	T												
Hap_23	CTCAG	TC	T												
Hap_24	CTCAG	TC	T												
Hap_25	CTCAG	TC	T												
Hap_26	CTCAG	TC	T												
Hap_27	CTCAG	TC	T												
Hap_28	CTCAG	TC	T												
Hap_29	CTCAG	TC	T												
Hap_30	CTCAG	TC	T												
Hap_31	CTCAG	TC	T												
Hap_32	CTCAG	TC	T												
Hap_33	CTCAG	TC	T												
Hap_34	CTCAG	TC	T												
Hap_35	CTCAG	TC	T												
Hap_36	CTCAG	TC	T												
Hap_37	CTCAG	TC	T												
Hap_38	CTCAG	TC	T												

Hap_39T.C.T.....G..T.....A.A.G.A..T..CAG.....A.....A.....T.....A.....T.
Hap_40	.T.C...A...GTC.C.G.TC.T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC...C.....T...GATT...A..
Hap_41C.T.....G..T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....G.....T.
Hap_42C.T.....AA.G.A.CTAT.C.G.....A.G.....G.....T.
Hap_43	.T..CTCAC.....TA.....AA...A..T..CAG.....A.....T.....T.....T.
Hap_44	.T..CT.A...C-T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC.....GATT.....T.
Hap_45	.T..CTCAC.....TA.T.....C.C...A...C...G.A..T..CAG.....A.....T.....T.
Hap_46	...GCT.A...G.TC-T.....C.C.TA...AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....T.....T.
Hap_47	.T.C...A...GT.C.TC.T.....G...A...A...CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_48	.T..CTCAC.....TA-T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC.....T.....T.
Hap_49	G...CT.A...T.....AA...A..T..CAG.....A.....AA.TATT.....T.
Hap_50	.T.C...A...GT.C.G.TC.T.....A...T..C.G.....A...C.....GATT.....T.
Hap_51	.T.C..T.C...T.TC.T.....AAA..G...G.A...AA...A.CTAT.C.GA...C.....A..TATT.....C.T.
Hap_52	.T..CT.C.....T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....TT
Hap_53C.T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....T.....T.
Hap_54G.TC.T.....AA...A..T..CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_55C.T.....G..T.....A.A...A..T..CAG.....A.....A.....T.....T.
Hap_56	.T.C...C...TC.TC.....C.....G...T.....G...CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_57	.T..CT.C.....T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.C.G.....TT
Hap_58	.T..CTCAC.....TA.T.....C.C...A...A...CAG.....A.G.....GATT.....TG.T.
Hap_59	.T..CTCAC.....TC.T.....A.....A...CAG.....A.....T.....T.
Hap_60	.T.C...A...GT.C.TC.T.....T.G...A...A...A.A.....A.G.A..TAT.....T.
Hap_61	.T.C...C...TC-T.....C.....G...A...A...CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_62	.T.C...C...TC-T.....C.....G...A...A...CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_63	.T..CTCAC.....TC-T.....AAA.T.....G.A..T..CAG.....A.....T.
Hap_64C.T.....AA...A..TAT.C.G.....A.G.....T.....T.
Hap_65	.T..CTCAC.....TA.T.....C.C...A...AA...A...C.A.A.....A..TATT.T..GATT.....T.
Hap_66	.T..CTCAC.....TA.T.....C.C...A...C...A..T.....A.....T.....T.
Hap_67TC-TTTAC.....A.....C.A...A.....A.....T.....T.
Hap_68	.TT..CT..C.C...T..T.....G...A...A...CAG.....A.....TG.T.
Hap_69	.T.C...A...GTC.C.G.TC.T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC.G..C.....T..CGATT.T..A..
Hap_70	.T.C...A...GTC.C.G.TC.T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC...C.....T.....A..
Hap_71	G...CT.A...C-T.....AAA.T.....AC.GA..T..CA.ATATGTAC.....T.....A..
Hap_72	.T..CTCAC.....TA.T.....C.C...A...C...A..T..CAG.....A.....T.....GATT.....T.
Hap_73	.T..CT.A...C-T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC...C.....A..
Hap_74	.T..CTCAC.....C-T.....AAA.T.....A...AC.GA..T..CA.ATATGTAC.....T.....A..
Hap_75	...C.....TC-TTTAC.....A.....C...A...A..T.....GATT.....T.
Hap_76	...GCT.A...G.TC-T.....T.....C.C.TA...AA...A...CAG.....A.....GATT.....T.
Hap_77C.T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....T.....T.
Hap_78C.T.....AA...A.CTAT.C.G.....A.G.....TT
Hap_79	G.....T.....A.CTAT.C.GA...C.....A..TATT.....T.

Sites 1–143 correspond to the IGS and 144–159 to the SSU gene. Dots indicate a nucleotide identical to haplotype 1, and dashes depict gaps.

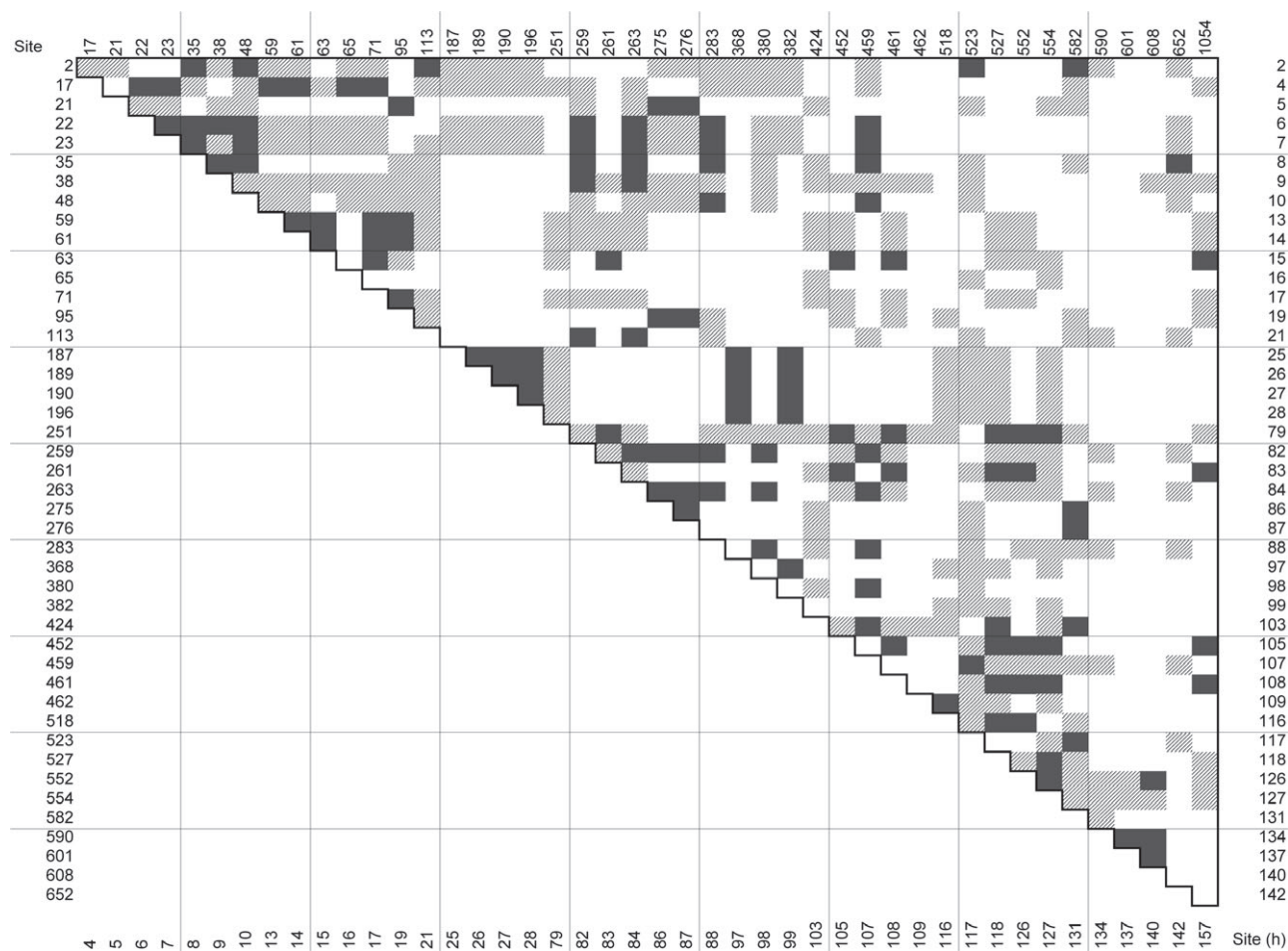


Fig. 1. Linkage disequilibrium (LD) analysis of the informative sites of the fragment of rDNA studied. The pairs shadowed indicate a $P < 0.001$ Fisher test, and those in black indicate the same probability but being still significant after the Bonferroni procedure. Only the sites that have revealed at least one significant test are shown. The sites are numbered relative to the whole fragment (up row and left column) and the haplotypes given in Table 1 (right column and lower row); all sites correspond to the IGS, except the two last (#652, #1054) that are located in the SSU gene.

and 808 haplotypes 28–38. Consequently, haplotypes cannot be organized in a consistent phylogenetic tree: Neighbour Joining, Maximum Likelihood and Bayesian methods, and even the same method with slight changes in the model parameters, give different topologies with low statistical support.

Linkage disequilibrium (LD) between the informative sites was tested with the program DNASP (Rozas *et al.*, 2003): from the 2278 two-by-two allele (gaps excluded) comparisons, only 123 produced significant χ^2 and Fisher tests after Bonferroni procedure (Fig. 1). Five hundred and seventy pairs of sites exhibited the four possible allelic combinations, and a minimum of 15 recombination events were necessary to explain the sequence diversity. Linked blocks from different parts of the fragment studied did not coincide with one another. Several examples can be inferred from Table 2 and some significant cases have been extracted to Table 3. Thus, haplotypes sharing a

given array of nucleotides in the first part of the fragment do not coincide with the haplotypes that share downstream sequences (see the blocks shadowed in Table 3). These results clearly indicate the existence of recombination and, for instance, haplotypes 48 and 74 could appear after the recombination of haplotype 16 (or any of those with a similar sequence) with haplotype 70.

The indels were analysed separately: eight indels were considered binary characters (0 = deletion; 1 = insertion) and the haplotypes were classified according to their indel composition (Table 4): 16 different combinations exist (named SQ1 to SQ16), and only two pairs (C \times E, and D \times G indels) proved significant LD after χ^2 tests; the remainder were found in random combinations. The phylogenetic relationships among the 16 different combinations of indels were assessed by means of median-joining networks (Bandelt *et al.*, 1999) and the results are shown in Fig. 2. SQ4 seems to be the primitive sequence type

Table 3. Partial haplotypes extracted from Table 2 in order to show examples of conserved blocks of mutations that otherwise are recombined in the different haplotypes.

Site

111111111111111111111111
1111112578888890000112222222333344444
46780345792890123483457889012345672478916789

Hap_1 TTAATAATTTTAT--TCITT-TAAA-----TGTTGA--A---
Hap_16 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..
Hap_19 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..
Hap_22 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..
Hap_28 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..
Hap_45 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..
Hap_58 .CTCC....AT.-C.CA.A..G-.....A...-..GATT
Hap_65 .CTCC....AT.-C.CA-A...A-----C..ATAT.GATT
Hap_66 .CTCC....AT.-C.CA-.....-.....-..
Hap_72 .CTCC....AT.-C.CA-.G.G-.....A...-..GATT
Hap_63 .CTCC....C.AAA.T...-G.G-.....A...-..
Hap_48 .CTCC....A.AAA.T..AAC.G.ATATGTAC)...-..
Hap_74 .CTCC....C.AAA.T..AAC.G.ATATGTAC)..-..
Hap_47 C...GT.C.C.-.....-G-.....A...-..GATT
Hap_60 C...GT.C.C.-.....A...A-----A.ATAT.GATT
Hap_50 C...GT.CGC.-.....-G-.....AC...-..GATT
Hap_69 C...GTCCGC.AAA.T..AAC.G.ATATGTAC.C.--TGATT
Hap_40 C...GTCCGC.AAA.T..AAC.G.ATATGTAC.C.--TGATT
Hap_70 C...GTCCGC.AAA.T..AAC.G.ATATGTAC.C.--T---

For the two blocks shadowed, there are haplotypes with one of them but not the other, haplotypes with both (Hap_48 and Hap_74), and some with none of them.

which, additionally, is the most frequent one, and was obtained from most geographical origins. Five haplotypes (SQ2, SQ5, SQ6, SQ9 and SQ13) derive from the previous one by a specific insertion and SQ16 by a deletion; the remaining sequences combine two or more from the previous indels. Thus, either we assume that those indels have occurred independently in several cases, or two different rDNA sequences of *N. ceranae* may recombine to produce a new sequence.

Discussion

Nosema ceranae shows a high diversity of rDNA sequences irrespective of whether the isolates came from extracts of individual or pooled honeybees. It is rather difficult to explain the diversity by mixed populations because this would imply that every honeybee would be systematically infected by several strains, and that after the proliferation of the parasite in the ventriculus of the insect, the microsporidian population would still have the same heterogeneity. Thus, the results support the idea that the strains are actually heterogeneous in their rDNA sequences: the different repeats are not identical. Different rDNA sequences in the same cell have also been detected in the closely related species *N. bombi*, a parasite of bumblebees, by Tay and colleagues (2005) and O'Mahony and colleagues (2007); an equivalent heterogeneity of sequences could also occur in *N. apis*, which also infects honeybees (Gatehouse and Malone, 1998).

Table 4. Insertion (1)/deletion (0) composition of the different haplotypes, extracted from Table 2 (n : number of haplotypes).

Indel		Haplotypes																
A	B	C	D	E	F	G	H											
42N	TTGTAT	AA	AT	TATGTA	AT	GATT	TG	n										
1	1	0	0	0	0	1	0	5	7	11	36	37	38					
1	1	0	0	0	0	0	0	1	21	3	20	34	65	60				
1	0	0	0	0	1	1	0	5	3	20	34	65	60					
1	0	0	0	0	0	0	0	19	1	2	6	8	9					
1	0	0	0	0	0	0	1	3	17	28	68							
1	0	0	1	0	0	0	0	13	16	23	30	32	41	26	27	31		
1	0	0	1	0	0	0	0	1	79					64	77	78		
1	0	1	1	0	1	0	0	1	51									
1	0	0	0	0	1	0	0	5	4	18	29	33	49					
1	0	1	0	0	0	0	0	2	35	63								
1	0	1	0	1	0	0	0	5	70	71	73	74	48					
1	0	1	0	1	0	1	0	3	40	44	69							
1	0	0	0	0	0	1	0	12	5	12	13	24	47	50	54	56		
1	0	0	0	0	0	1	1	58						61	62	72		
1	0	0	0	0	0	1	0	2	25	75								
0	0	0	0	0	0	0	0	1	67									

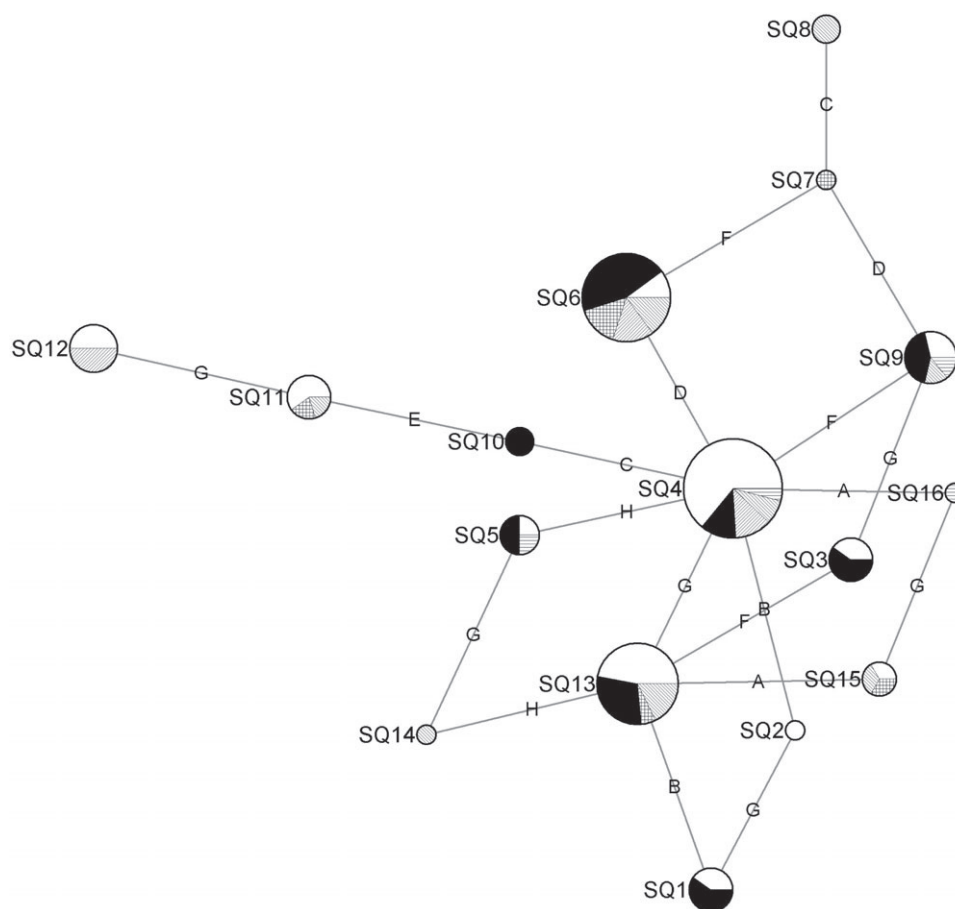


Fig. 2. Median-joining network for the 16 combination of indels given in Table 2. Circles are proportional to the corresponding number of haplotypes found. The shadow of each sector refers to the geographical origin of the isolate: Spain (white), France (crossed), Germany (left diagonal), Slovakia (right diagonal), Slovenia (horizontal) and Kyrgyzstan (black). Each step on the branches represents a single indel.

This suggests that the phenomenon might be common in the genus *Nosema*. The coexistence of different sequences explains why the sequencing of certain rDNA fragments leads to overlapping patterns: PCR followed by sequencing will provide mixed results difficult to interpret; at best, if a single sequence is readable, it would either correspond to only one or to a consensus of all those existing in a given strain. Recently, Chen and colleagues (2009) obtained a phylogenetic tree for different isolates of *N. ceranae* correlated with the geographical origin of the isolates. These results are not easy to adapt to ours, since we have demonstrated that identical haplotypes can be obtained in samples from extremely different origins (such as Spain, Slovenia and Kyrgyzstan) and, conversely, different haplotypes are obtained from the same sample. Chen and colleagues (2009) analysed a 250 bp fragment downstream from the LSU gene. Apparently these authors performed direct sequencing of PCR products and no intra-strain differences were reported. As we have shown after comparing the first 560 bp of SSU gene with the 615 bp of the IGS, the former is much less

diverse, as expected from the higher selective pressure on coding sequences. However, variants of the SSU gene were also found in the same isolate such as, for instance, haplotypes both with and without the GATT insertion. The fragment analysed by Chen and colleagues (2009) varied among isolates but, considering our results, it is certainly unexpected that the comparison of one sequence per strain may reflect the geographical origin of the isolates. Both Ironside (2007) and Fries (2010) pointed out that rDNA sequences are not appropriate to phylogenetic approaches in the genus *Nosema*. We fully agree with this viewpoint, and the accurate inference of phylogenetic relationships among species or strains in *Nosema* has to be established on the basis of non-repeated loci. The comparisons of the rDNA sequences of *N. ceranae* presently available in the GenBank should be regarded with serious caution.

The coexistence of different rDNA repeats in *N. ceranae* raises some relevant questions. First, it is clear that concerted evolution is not occurring. According to Eickbush and Eickbush (2007) concerted evolution for

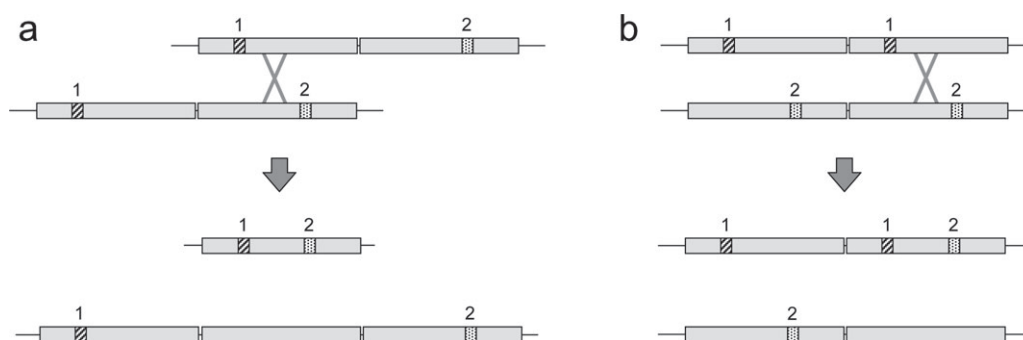


Fig. 3. Origin of new sequence variants by recombination.

A. Sister chromatid exchange generates new combinations of alleles that are already present in different repeats of a same genome.

B. Homologue recombination requires a diploid stage where two genomes of different origin meet in the same cell.

repeated sequences such as rDNA may be due to different mechanisms. New mutations may spread (or be eliminated) by unequal recombination at meiosis, SCE and gene conversion. In the absence of meiosis, SCE and gene conversion alone must be responsible for homogenizing repeated sequences. It is an open question why concerted evolution has not been achieved in *N. ceranae*, while other microsporidia, such as *E. cuniculi*, do not seem to show any sequence heterogeneity. Having a single type of ribosome has been considered a selective advantage which would contribute to concerted evolution. However, Carranza and colleagues (1999) described a conservation of different rDNA copies, apparently functional, in the evolution of some groups of animals, suggesting an adaptive role for the coexistence of different ribosomes. This suggests that two or more coexisting types of ribosome might be adaptive to *N. ceranae*. A functional analysis on whether those mutations affect the SSU rRNA to some degree should be performed to clarify this point.

Given the diversity of rDNA sequences in *N. ceranae*, an important question is how such variability is being generated. Although some hotspots may exist along the fragment studied, recurrent mutation can be discarded as a general mechanism for creating identical arrays of alleles involving many sites. We must keep in mind that a clonal mode of reproduction should derive in a strong LD, as a new set of mutations would occur in a particular haplotype but not in another one. Nevertheless, for most polymorphic sites analysed here LD was not significant. Instead we provide evidence that recombination is occurring in *N. ceranae*: consistent blocks of alleles exist in different parts of the sequences, but they appear shuffled from clone to clone. A number of haplotypes can be easily explained by the recombination between others (Table 3).

Indels are usually considered robust genetic markers because it is extremely unlikely that, except for short tandem repeats, the same fragment would be inserted or deleted twice exactly at the same site. Therefore, it seems

reasonable to assume that the indels described represent unique events. However, we have found different combinations of indels: for instance, five haplotypes (out of the total 79) had a 6 bp insertion in the IGS, 15 had the GATT insertion in the SSU gene, and three had both (insertions E and G in Table 4). Discarding recurrent rearrangements, the reticulate network shown in Fig. 2 can only be explained by recombination. Indeed, a minimum of 15 recombination events was estimated to explain the haplotype diversity described.

The existence of recombination is quite surprising in organisms that are believed to have an asexual mode of reproduction (Lee *et al.*, 2008). If we assume that a given strain has two or more alternative rDNA haplotypes, then SCE may create new combinations, as well as a different number of repeats (Fig. 3). However, intra-strain recombination can only generate new haplotypes after pre-existing diversity in that strain, or after new mutations. This would make it necessary that the ancestor of *N. ceranae* in virtually all geographical origins already carried a wide range of sequences among its rDNA repeats. That is, the ancestor had to possess copies with all the indels described, as well as copies without them, and the same should occur for the alternative arrays of SNPs, which seem rather unlikely.

Independently of how *N. ceranae* is being transmitted among honeybees, the only way that two sequences may recombine is that they meet together in the same cell. Therefore, the fact that a number of consistent motifs were found in different haplotypes from samples of *N. ceranae* from very different geographical origins suggests that sequences of different lineages be present in the same cell, undergo homologous recombination and produce new variants that did not exist in any of the 'parental' strains. This implies the existence of a transient diploid stage after the fusion of different cells that have infected the same host, somewhat equivalent to sex. It is important to keep in mind the suggestion by Ironside (2007) that since sex seems to have been lost indepen-

dently in different clades of microsporidia, some species could hypothetically have maintained a sexual cycle. The opportunity for recombination between different lineages offers a new insight into the biology of *N. ceranae*, since the possibilities for evolution and adaptation, including the development of resistance to fungicides or host defences, are certainly much wider than those under a strict clonal mode of reproduction. This, as well as the fact that rDNA genotyping is not a reliable marker, has to be considered in any further approach to the phylogeny and epidemiology of *N. ceranae*.

Experimental procedures

Total DNA was extracted following the method described by Martín-Hernández and colleagues (2007) from 12 samples naturally infected by *N. ceranae*: five individual honeybees, *A. mellifera* (NP71, NP72, 48-2, 48-3 and P31), collected in three colonies from different localities in Guadalajara (Spain), and seven samples of pooled honeybees from a given colony, each one from a different geographical origin: Huesca, Spain (953), France (1109), Germany (991), Slovakia (807), Slovenia (SLO7) and Kyrgyzstan (808 and 809). Valera and colleagues (2010) analysed the dissemination of *N. ceranae* among these samples. PCR was performed with the pair of primers named R3-upper (5'-TTACTGGCTTAACCTTCGGAGAG-3') and R3-lower (5'-GGTATCTAATCATCTTCGCTCCT-3') which amplify a 1283 bp fragment containing the complete IGS and part of the SSU gene. PCR reactions were prepared in a final volume of 25 µl per tube, including 5 µl of template DNA solution, 0.4 mM deoxynucleotide triphosphates, 0.4 µM of each primer, 0.48 µg per tube of BSA (Roche Molecular Biochemicals), and 1 U of Platinum® *Taq* polymerase and its correspondent buffer (Invitrogen) plus 2 mM MgCl₂ were used. PCR was performed in a PTC-100 thermocycler (MJ Research) with the following programme: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 95°C for 1 min, 57°C for 1 min, and 68°C for 1.5 min, plus a final step at 68°C for 10 min. The tubes were then maintained at 4°C, and 5 µl of the PCR products were resolved on standard 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. The rest of the PCR products were cloned in *Escherichia coli* plasmid pCR2.1-TOPO® with TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, K4500-01) following the manufacturer's instructions. The plasmids were extracted from bacteria using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 27106). A sample of each plasmid was digested with EcoRI (Roche Biochemicals 703737) and separated in agarose gel electrophoresis in order to check the correct size of the insert. The inserts from the different clones were sequenced using the above primers plus NOS2-upper (5'-CGGCTTAATTTGACTCAAC-3') and NOS3-lower (5'-AAGTAATACCGTTACCCGTCA-3') by Genyca-Innova S.L. (Majadahonda, Spain) and Unidad de Genómica of the Universidad Complutense (Madrid, Spain).

A total of 105 complete fragments were obtained. The approximately 1175 bp available for analysis covered the IGS (~615 bp) and the first part of the SSU (~560 bp). The sequences were aligned following the CLUSTAL W algorithm (Thompson *et al.*, 1994) with the program BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall, 1999). DNA polymorphism indexes, LD and recombina-

tion events were calculated with the program DNAsP (Rozas *et al.*, 2003). Haplotype median networks (Bandelt *et al.*, 1999) were performed with NETWORK 4.5.1.0 program (Fluxus Technology). ARLEQUIN 3.11 program (Excoffier *et al.*, 2005) was used to estimate the differentiation between the geographical origins of the isolates; the Fixation Index (F_{ST}) significance was estimated by a permutation test with $n = 1023$. Neighbour Joining (NJ), UPGMA and Minimum Evolution (ME) trees were constructed with MEGA 4.0 program (Tamura *et al.*, 2007), using the Kimura two-parameter model; Maximum Likelihood (ML) trees were estimated with TREE-PUZZLE 5.2 program (Schmidt *et al.*, 2002) and Bayesian trees with MRBAYES 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

Acknowledgements

This work was supported in part by JCCM and Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (API/FEGA-MAPYA FOUNDS). R. Martín-Hernández was co-financed by the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) and INIA-European Social Fund. The authors thank Dr C. Bartolomé and Dr L. Prieto for constructive revision of the text, and C. Botias and M.E. Garrido-Bailón for their help in laboratory work. The authors are indebted to Brian Crilly for his helpful revision of the manuscript.

References

- Acinas, S.G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M. (2005) PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8966–8969.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 399–451.
- Antúñez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M. (2009) Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* **11**: 2284–2290.
- Bandelt, H.J., Forster, P., and Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37–48.
- Becnél, J., and Andreadis, T. (1999) Microsporidia in insects. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner, M., and Weiss, L.M. (eds). Washington, DC, USA: ASM, pp. 447–501.
- Brugère, J.F., Cornillot, E., Méténier, G., Bensimon, A., and Vivarès, C.P. (2000) *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 2026–2033.
- Canning, E., and Lom, J. (1986) *The Microsporidia of Vertebrates*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Carranza, S., Baguña, J., and Riutort, M. (1999) Origin and evolution of paralogous rRNA gene clusters within the flatworm family Dugesidae (Platyhelminthes, Tricladida). *J Mol Evol* **49**: 250–259.

- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., and Pettis, J.S. (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol* **97**: 186–188.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., *et al.* (2009) Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J Invertebr Pathol* **101**: 204–209.
- Clarke, L.A., Rebelo, C.S., Gonçalves, J., Boavida, M.G., and Jordan, P. (2001) PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol* **54**: 351–353.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., *et al.* (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog* **5**: 1–14.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, L.B., and Shadduck, J.A. (1995) Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* **111**: 411–422.
- Eickbush, T.H., and Eickbush, D.G. (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477–485.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* **1**: 47–50.
- Franzen, C., and Müller, A. (2001) Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* **3**: 389–400.
- Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **103** (Suppl. 1): S73–S79.
- Fries, I.M., Feng, F., Silva, A.J., Slemenda, S.B., and Pieniazek, N.J. (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* **32**: 356–365.
- Gatehouse, H.S., and Malone, L.A. (1998) The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol* **71**: 97–105.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.
- Haro, M., del Águila, C., Fenoy, S., and Henriques-Gil, N. (2003) Intraspecific genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J Clin Microbiol* **41**: 4166–4171.
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* **92**: 93–95.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., and Nozal, M. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* **10**: 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P., and Meana, A. (2009a) Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep* **1**: 495–498.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., *et al.* (2009b) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* **1**: 110–113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., *et al.* (2010) A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol Rep* **2**: 243–250.
- Huang, W.F., Bocquet, M., Lee, K.C., Sung, I.H., Jiang, J.H., Chen, Y.W., and Wang, C. H. (2008) The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *J Invertebr Pathol* **97**: 9–13.
- Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., and Wang, C. H. (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* **38**: 30–37.
- Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754–755.
- Ironsides, J. E. (2007) Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evol Biol* **29**: 48.
- Keller, I., Chintauan-Marquier, I. C., Veltsos, P., and Nichols, R. A. (2006) Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution. *Genetics* **174**: 863–874.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., *et al.* (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **96**: 1–10.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., III, Torres-Martínez, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., and Heitman, J. (2008) Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr Biol* **18**: 1675–1679.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., and Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6331–6338.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., *et al.* (2009) Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2554–2557.
- Mathis, A. (2000) Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* **30**: 795–804.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R., and Deplazes, P. (1999) Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int J Parasitol* **29**: 767–770.
- Nei, M., and Rooney, A.P. (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* **39**: 121–152.
- Office International des Epizooties (OIE) (2008) Chapter 2.2.4, Nosemosis of honeybee. In *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines* [WWW document]. URL http://www.oie.int/Eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T., and Paxton, R.J. (2007) Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J Eukaryot Microbiol* **54**: 103–109.

- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., and Fries, I. (2007) *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**: 558–565.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003) DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496–2497.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., and von Haeseler, A. (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**: 502–504.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599.
- Tay, W.T., O'Mahony, E.M., and Paxton, R.J. (2005) Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 505–513.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Valera, F., Martín-Hernández, R., and Higes, M. (2010) Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European Bee-Eaters *Merops apiaster*. *Environ Microbiol Rep* (in press): doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00186.x.
- Weiss, L.M. (2003) Microsporidia 2003: IWOP-8. *J Eukaryot Microbiol* **50** (Suppl.): 566–568.
- Williams, G.R., Shafer, A.B., Rogers, R.E., Shutler, D., and Stewart, D.T. (2008) First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*) in Canada and central USA. *J Invertebr Pathol* **97**: 189–192.
- Wittner, M., and Weiss, L.M. (1999) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC, USA: ASM press.
- Zander, E. (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenztg* **24**: 147–150.

Capítulo III

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Análisis de distintas secuencias del 16S rRNA expresadas en el parásito de la abeja de la miel *Nosema ceranae* (Microsporidia)

Soledad Sagastume, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes y Nuno Henriques-Gil

Hasta la fecha, algunos organismos han demostrado poseer un ARN ribosómico variable aunque, contrariamente, éste se considere un ejemplo clásico de uniformidad por evolución concertada.

El polimorfismo del rRNA 16S en *Nosema ceranae* analizado aquí es notable, puesto que los microsporidios son parásitos intracelulares que han sufrido una fuerte reducción de sus genomas y organización celular. Además, *N. ceranae* infecta la abeja *Apis mellifera* y se ha asociado con el fenómeno de la pérdida de colonias durante la última década. Las variantes del 16S-rRNA incluyen sustituciones de un solo nucleótido, inserciones-deleciones de una sola base, además de un indel que abarca un tetranucleótido. Nosotros mostramos aquí que las distintas variantes genéticas encontradas se expresan.

Los sitios polimórficos tienden a localizarse en determinadas regiones de la molécula de rRNA y la comparación con la estructura secundaria del 18S rRNA de *E. coli* indica que la mayoría de las variaciones probablemente no interfiere en la actividad ribosómica.

El hecho de que los polimorfismos en un organismo tan mínimo como *N. ceranae* se mantengan a lo largo de muestras de todo el mundo sugiere que la existencia de distintos transcritos de rRNA podrían jugar un papel adaptativo en los microsporidios.

ORIGINAL ARTICLE

Ribosomal Gene Polymorphism in Small Genomes: Analysis of Different 16S rRNA Sequences Expressed in the Honeybee Parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia)

Soledad Sagastume^a, Raquel Martín-Hernández^{a,b}, Mariano Higes^a & Nuno Henriques-Gil^c

a Centro Apícola Regional, Bee Pathology Laboratory, Marchamalo, Guadalajara, 19180, Spain

b Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Parque Científico de Albacete, Spain

c Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo, Campus de Montepríncipe, Madrid, 28668, Spain

Keywords

Apis mellifera; genetic variability; insertion-deletion; *Nosema ceranae*; ribosomal small subunit; RNA secondary structure; single nucleotide polymorphism.

Correspondence

Nuno Henriques-Gil, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo, Campus de Montepríncipe, 28668 Madrid, Spain
Telephone number: +34-91-372-4700;
FAX number: +34-91-352-0496;
e-mail: nhengil@ceu.es

Received: 11 June 2013; accepted August 14, 2013.

doi:10.1111/jeu.12084

ABSTRACT

To date, few organisms have been shown to possess variable ribosomal RNA, otherwise considered a classic example of uniformity by concerted evolution. The polymorphism for the 16S rRNA in *Nosema ceranae* analysed here is striking as Microsporidia are intracellular parasites which have suffered a strong reduction in their genomes and cellular organization. Moreover, *N. ceranae* infects the honeybee *Apis mellifera*, and has been associated with the colony-loss phenomenon during the last decade. The variants of 16S rRNA include single nucleotide substitutions, one base insertion-deletion, plus a tetranucleotide indel. We show that different gene variants are expressed. The polymorphic sites tend to be located in particular regions of the rRNA molecule, and the comparison to the *Escherichia coli* 16S rRNA secondary structure indicates that most variations probably do not preclude ribosomal activity. The fact that the polymorphisms in such a minimal organism as *N. ceranae* are maintained in samples collected worldwide suggest that the existence of differently expressed rRNA may play an adaptive role in the microsporidian.

MICROSPORIDIA have been controversial for a long time, with both puzzling eukaryotic and prokaryotic features. Although they lack mitochondria, it is now clear that they have a mitochondriate ancestry but have lost those organelles as part of a number of adaptations to the intracellular parasitic way of life. A strong genome reduction has occurred in most microsporidian lineages, up to extreme cases such as the human and vertebrate species parasites *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis* with 2.9 and 2.3 Mbp, respectively (about half the amount of DNA of *Escherichia coli*), organized in 11 eukaryotic chromosomes (Keeling and Corradi 2011). Their relationship with Fungi has received several lines of evidence (Adl et al. 2012; Lee et al. 2008) and their basal position in the Fungi phylum has recently been demonstrated (Capella-Gutiérrez et al. 2012). Apparently, most Microsporidia reproduce only in a clonal way but a sexual cycle, including meiosis, exists in various lineages (Ironsides 2007).

The microsporidian parasite *Nosema ceranae* has become a severe pathogen in the last decade: it infects the cells of the gut epithelium of bees and is associated with colony-loss phenomenon in *Apis mellifera*, causing

major economic damage in the honey industry (Bromenshenk et al. 2010; Eischen et al. 2012; Higes et al. 2008, 2009). It appears that the original host of *N. ceranae* is the Asian honeybee, *Apis cerana*, and it is this microsporidium which has infected the European honeybee *A. mellifera* in the last decade (Botías et al. 2012; Fries 2010; Higes et al. 2006; Huang et al. 2006; Klee et al. 2007; Martín-Hernández et al. 2007). Moreover, *N. ceranae* has proved to be not only more virulent but also more resistant to environmental changes than *Nosema apis* (Higes et al. 2010), though further studies are needed to establish whether or not this is the cause of *N. ceranae* spreading colony loss in warmer geographical areas.

According to Cornman et al. (2009) the genome size of *N. ceranae* may have around 8 Mbp. In an overview of the genome, these authors noticed that the ribosomal loci were “recalcitrant” to the genome assembly parameters because they seemed to be very polymorphic. Intraspecific variability of DNA sequences has been described in a number of Microsporidia. Part of such diversity may be related with the biological properties of the different strains (Haro et al. 2006) and adaptation to specific hosts

(Xiao et al. 2001). In a previous work, Sagastume et al. (2011) showed that the rDNA of *N. ceranae* is highly polymorphic, especially in the intergenic spacer (IGS), and the haplotypes found suggested that recombination is occurring in this species. The diversity also extended to the small subunit (SSU), 16S ribosomal RNA gene (the first 600 bp of this gene were then analysed) and included single nucleotide polymorphisms (SNP) and small insertions-deletions (indels).

Ribosomal RNA genes are usually assumed to have an almost perfect sequence identity among the different repeats existing in the genomes (Ueno et al. 2007). Indeed, sequence conservation is considered to be necessary for the finest translational efficiency (Van Spaendonk et al. 2001). A number of mechanisms, such as unequal meiotic recombination, sister chromatid exchanges, and gene conversion, lead to concerted evolution (Eickbush and Eickbush 2007). The birth-and-death model can also lead to a similarity of duplicated genes: new copies are formed by gene duplications, some may persist for long time periods, while others are lost by deletion or simply become pseudogenes; the identity is, most of all, a consequence of a strong purifying selection. In actual fact, the data obtained from a number of rRNA genes fit better to the predictions of the birth-and-death than those of the concerted evolution model (Nishimoto et al. 2008; Rooney 2004; Rooney and Ward 2005).

Nevertheless there are some cases where different functional rDNAs are maintained. In *Streptomyces* strains the heterogeneity of rDNA sequences can be divided in two groups evolving by different mutation-selection mechanisms (Ueda et al. 1999). Mylvaganam and Dennis (1992) proposed the two adjacent different rRNA functional operons in *Haloarcula marismortui* could be the result of either a lost ability to homogenize the repeated sequences, or to a hypothetical chimerical origin of this archaeobacterium. Carranza et al. (1999) reported that two different copies of rDNA exist in all the species analysed from a family of flatworms (but not in other related families). The two types evolve at different rates, and most probably both of them are functional. The case of the microalga *Prototheca wickerhamii* is especially interesting: Ueno et al. (2007) observed not only multiple sequences of 18S rRNA but also that recombination occurs to produce new types. The most studied example of different ribosomes in the same species is that of *Plasmodium berghei*, as three types of transcribed rRNA genes are expressed in different stages of the parasite cycle (Gunderson et al. 1987). However, Van Spaendonk et al. (2001) demonstrated that those ribosomes are functionally equivalent, suggesting that the maintenance of additional rRNA units simply represent a gene dosage phenomenon, although some functional significance could not be excluded. The intragenomic polymorphism for the ribosomal SSU of the foraminifer *Elphidium macellum* has recently been suggested to be a consequence of hybridization between differentiated populations (Pillet et al. 2012).

The discovery of different SSU genes co-existing in the same strains of *N. apis* (Gatehouse and Malone 1998), *Nosema bombi* (O'Mahony et al. 2007), *N. ceranae* (Sagastume et al. 2011) and *Nosema bombycis* (Liu et al. 2013) is even more unexpected given the extreme reduction of Microsporidia genome stated above. Under strong selective pressure to keep only a minimum of functions, the maintenance of different ribosomes suggests some biological significance.

Keeping those facts in mind, our first aim was to determine if the polymorphism was occurring all along the SSU gene of *N. ceranae*. Secondly, it was essential to ascertain that the different SSU gene variants were actually expressed. In *E. cuniculi* rDNA clusters are repeated and located in the telomeres of the chromosomes (Katinka et al. 2001), although it is not known whether all of them are expressed or not (intrastrain variation has not been described). This opens the possibility that some rDNA repeats could actually be pseudogenes with no more than some structural roles in the microsporidian genome. Thus, the existence of nucleotide sequence variation has also to be analysed in the 16S RNA. Finally, if different 16S RNAs exist in the same *N. ceranae* strain, the positions of the polymorphic sites in the secondary structure may provide important clues about their hypothetical biological significance. Since the complete studies of the *E. coli* ribosomal RNA secondary and tertiary structures specific roles have been ascribed to different helices (Schmeing and Ramakrishnan 2009). Mutations in specific points can produce different consequences in ribosomal functions such as defects in the start codon selection (the most deleterious mutations directly related with the initiation factors bind), defects in aminoacyl-tRNA selection (missense and nonsense suppressor mutations) or increase +1 frameshift (for review see McClory et al. 2011).

MATERIAL AND METHODS

Biological samples, DNA extraction and cloning

Total DNA was extracted following the method described by Martín-Hernández et al. (2007) from forager honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) naturally infected by *N. ceranae* from Guadalajara (Spain). PCR was performed with the pair of primers NOS3-upper (5'-ACTGGCTTAACCTCGGAGAG-3') and NOS2-lower (5'-TCCTCCTTTTAATGATATGCT-3') which amplify a 2101-bp fragment containing the complete IGS, the small SSU and the internal transcribed segment (ITS). PCR reaction started with 0.5 µl of template DNA, 0.4-µM of each nucleotide, 0.2-µM of each primer, 1.5-units of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, cat no. 11509-015, Paisley, U.K.), its 10X buffer, 25 nmol MgCl₂, 12-µg of BSA (Roche Diagnostics, cat no. 10711454001) and sterilized distilled water up to a final volume of 25 µl. PCR was performed in a Eppendorf Mastercycler EpGradient Pro S thermocycler with the following program: 94 °C for 2 min followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 2.15 min, plus a final step at 68 °C for 7 min. The PCR product was

kept at 4 °C, and a 5 µl sample was resolved in standard 2% agarose gels (Invitrogen E-GEL 2% Agarose GP, cat no. G8008-02) and visualized by ethidium bromide staining. The PCR product was purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, cat no. 28104, Hilden, Germany); a sample of 4-µl was employed for cloning in *E. coli* plasmid pCR2.1-TOPO® with TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, cat no. K4500-01) following the instructions of the manufacturer. The plasmid DNA was extracted from five randomly selected clones and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, cat no. 27106). A volume of 5-µl of plasmid was digested with *EcoRI* (New England Biolabs, R0101S) and separated in 1% agarose gel electrophoresis to check the correct size of the insert. The inserts from the different clones were sequenced at Fundación Parque Científico de Madrid, Campus de Cantoblanco (Spain) using the following primers: NOS3-upper (see above), NOS1-upper (5'- GCATGTTTTGACATT GAAA-3'), NOS2-upper (5'-CGGCTTAATTGACTCAAC-3'), R2-upper (5'- AGCAGCCGCGTAATACTTGT-3') and NOS2-lower (see above) which, respectively, anneal at positions 63, 779, 1123, 1503 and 2143 of a reference sequence that includes part of the 5S RNA gene, the IGS, the SSU gene, the ITS, and the large subunit (LSU) gene, combining the overlapping sequences EF091880 and DQ486027 (Fig. 1).

RNA extraction and retro-transcription

Three different samples (CF1, C2 and CC1) of Percoll purified *N. ceranae* spores from three different apiaries of Guadalajara, obtained as described previously by Botías et al. (2012) and Martín-Hernández et al. (2011), were used for the rRNA analysis.

The RNA was extracted from samples containing 5×10^6 to 1×10^7 spores diluted to a final volume of 200 µl in cold sterilized distilled water. An additional sample with 200 µl of cold sterilized distilled water was used as negative control. To break the spore wall, the samples were introduced in a MagNA Lyser Green Beads vial (Roche Diagnostics, cat no. 03 358 941 001) and shaken 95 s at 6,000 rpm into MagNA Lyser instrument (Roche). The supernatant was recollected in a new vial and total RNA was extracted with MAGNAPURE Compact RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, cat no. 04802993001) using a MagNA Pure COMPACT instrument (Roche). The extracted RNA and the negative control were resolved in standard 1.2% agarose gels (Invitrogen E-Gel 1.2% Agarose GP, cat no. G5018-01), visualized by ethidium bro-

mid staining and quantified with NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, DE). For samples CF1, CC1 and C2, 25.1, 28.1 and 28.2-ng/µl of RNA were obtained, respectively.

To maintain the borders of the RNA, we carried out a retro-transcription with ExactSTART™ Full-Length cDNA Library Cloning Kit (Epicentre Biotechnologies, cat no. ES0907, Madison, WI). A previous step to prepare the 5'-monophosphorylated extremes of ribosomal RNA was performed by adding a poly-A tail with Epicentre Poly(A) Polymerase Tailing Kit (Epicentre, cat no. PAP5104H), following the instructions of the manufacturer except that the water volume was replaced by the same volume of additional RNA extract due to its low concentration. The mixture was incubated 20 min at 37 °C and the products were kept at -20 °C for 1 h to stop the enzyme reaction. Then, 10 µl of reaction products were resolved in standard 1.2% agarose gels (Invitrogen E-Gel 1.2% Agarose GP, cat no. G5018-01) and visualized by ethidium bromide staining.

A double strand of cDNA was created using 2.5 units of proofreading polymerase Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche Diagnostics, cat no. 3300226), its 5X buffer and RNase-free water up to a final volume of 100-µl. RT-PCR was performed using the same thermocyclers described above with the following program: 94 °C for 30 s followed by 18 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 68 °C for 4 min, plus a final step at 68 °C for 7 min. The cDNA was kept at 4 °C until the next PCR.

SSU rRNA amplification and cloning

PCR was performed with the pair of primers NOS1-upper (see above) and NOS1-lower (5'- GCGTTGAGTCAAAT TAAGC -3') which amplify a 750 bp fragment of the SSU gene. PCR reaction started with 5-µl of cDNA, 0.4-µM of each nucleotide, 0.2-µM of each primer, 1.5 units of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, cat no.11509-015), its 10X buffer, 25 nmol of MgCl₂, 12-µg of BSA (Roche Diagnostics, cat no. 10711454001) and sterilized distilled water up to a final volume of 25 µl. PCR was performed in the same thermocyclers as described, with the following program: 94 °C for 2 min followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 68 °C for 1 min, plus a final step at 68 °C for 7 min. The PCR product was kept at 4 °C, and 5-µl was resolved on standard 2% agarose gels (Invitrogen E-GEL 2% Agarose GP, cat no. G8008-02) and visualized by ethidium bromide staining. The cloning of the products, extractions and purification of plasmids and *EcoRI* digestions were performed in the same way as described above. The inserts from the different clones were sequenced using the commercial primers M13 at Fundación Parque Científico de Madrid, Campus de Cantoblanco (Spain).

In vitro fidelity and lack of recombination test

A partial sequence of 1279-bp of a protein coding gene of *N. ceranae* (Genbank reference XM002996639) which showed allelic variability (unpublished results) was used in

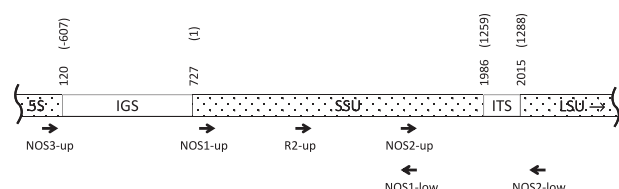


Figure 1 Localization and absolute positions in the *Nosema ceranae* rDNA amplicon of the PCR primers employed. The positions relative to the beginning of the 16S rRNA gene are given in brackets.

this test. Two clones (in the same vector pCR 2.1 TOPO described above), differing in 6 bp, at the positions 27, 28, 95, 347, 909 and 1135, were selected as templates for the PCR control to test in vitro fidelity of the polymerase and the lack of recombination. 40 ng of each plasmid were mixed together for PCR using the primers xm639-up (5'-GTAAAAAAGTGGGATATTCA-3') and xm639-low (5'-ACAAATCTATCTCTTATCCCT-3'), with the following program: 2 min at 94 °C, 45 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 1.5 min at 68 °C, plus a final step of 7 min at 68 °C; the number of cycles was chosen to be especially high to increase the probabilities of hypothetical in vitro recombination events. The PCR product was cloned again in the same condition, and 30 clones were finally sequenced.

16S rRNA secondary structure

The localization of the polymorphic sites in the secondary structures of SSU RNAs were based on the model available for *N. ceranae* in <http://www.rna.cccb.utexas.edu/>. The helices were drawn using the program VARNA 3.8 (Darty et al. 2009).

Sequence alignment and polymorphism analyses

DNA sequences were edited and aligned following the CLUSTAL W algorithm (Thompson et al. 1994) with the program BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall 1999). The haplotypes were generated with DNAsP (Librado and Rozas 2009), which was also employed to calculate the polymorphism indexes.

RESULTS

To ensure the in vitro fidelity of PCR and the lack of recombination, which is known to occur under some experimental conditions (Judo et al. 1998; Lahr and Katz 2009; Meyerhans et al. 1990), we performed a preliminary experiment. Two clones of known sequence differing in 6 bp spread along a 1279 bp fragment were used as a template for the control amplification. One single de novo mutation was found among the total 37,770 nucleotides (30 clones × 1259 bp). Except for that single mutation, all the fragments fitted completely to one of the two original sequences, that is, under the conditions tested, no in vitro recombination was detected.

Five different sequences of the complete 16S rRNA gene were obtained from *N. ceranae* infected honeybees: SSU-2, SSU-3, SSU-7, SSU-8 and SSU-13 (GenBank accessions JX205149 to JX205152, and JX205129, respectively); the differences include nine point substitutions, plus four indels of a single nucleotide and one indel of the tetranucleotide GATT (Fig. 2). Four SNPs and the latter indel had also been found in a previous work with *N. ceranae* isolates from very different sources (Sagastume et al. 2011). It is important to note that, given the preliminary validation, the results cannot be attributed to PCR errors or in vitro recombination between slightly different sequences.

	0001111233344446666666666899	
	47811280224789244566667437	
Haplotype	645789089896509227912688690	Sequence
Hap_1	GAA---GTGGGTATTTCAGA-GA--G	SSU-8
Hap_2	A.G-----A.....G...TT.	SSU-2
Hap_3	A.....GAA..T.	SSU-3
Hap_4	A..GATT.....C.....TT.	SSU-7
Hap_5	A.....C.....G-A..T-A	SSU-13
Hap_6A.....-A.	C2.1
Hap_7	G.....-A.	C2.8
Hap_8C.....-AG	C2.5
Hap_9G-A.	C2.2, C2.15, C2.9
Hap_10G..C..CG..	C2.7
Hap_11C.....	C2.3, C2.4, C2.17, CF1.11,CC1
Hap_12C.....	C2.6
Hap_13G-A.	C2.10
Hap_14	..GATT.....-A.	C2.13
Hap_15	..GATT.....A.....	C2.12
Hap_16	..GATT.....-A.	C2.14
Hap_17	..GATT.....CT.....-A.	CF1.10
Hap_18C.....	C2.16
U26533	A.....A.....GAA..T.	Reference

Figure 2 Haplotypes of the different 16S RNA sequences found. The positions of the alternative nucleotides or indels are given relative to the complete sequence including all possible insertions (hence it corresponds to a total of 1266 bp instead of 1259 bp in the reference sequence U26533). The first five haplotypes were obtained from the entire 16S RNA gene sequence, while the remainder proceeds from a fragment of 750 bp of the ribosomal RNA (nucleotides 52–801). Note that, at least in their common 750 bp, the haplotypes 1 and 11 are identical.

After the isolation of total ribosomal RNA and retrotranscription to cDNA, 19 clones containing 750 bp of the 16S RNA (nucleotides 52–801) were analysed, revealing 13 different sequences: one of them was found in five clones (which was also identical to SSU-8 clone above), another was found three times and the remaining 11 were unique findings (GenBank accessions JX205130 to JX205148). The haplotypes are shown in Fig. 2.

In the final alignment of all sequences, 27 variable points were detected: 19 substitutions (17 transitions and 2 transversions), four single nucleotide insertion-deletions (indel) in poly-nucleotide segments, and the frequent indel of the GATT tetranucleotide. All of them were named following the alignment positions. Considering that the variations are not randomly located (see below) and that a number of them were also detected in different studies and in expressed 16S rRNA, it is clear that not only different sequences of the SSU gene exist in the genome of *N. ceranae*, but different ribosomal RNA sequences are also being expressed.

The polymorphism indexes (PI), calculated with the program DNAsP 5.10 for the two groups of sequences – the five complete SSU and the 750 bp fragment – were very similar: 0.0032 and 0.0029, respectively, indicating that, in terms of diversity, the smaller fragment seems to be representative of the entire gene. The average number of nucleotide differences (k) between two 16S rRNA genes is four. The polymorphic sites tend to be located at specific regions. Figure 3 shows the variation of the PI along the sequence (a sliding window of 25 nucleotides was considered): it is noteworthy that the variable zones coincide for the two groups of sequences.

To locate the variable points in the SSU, the secondary structure was redrawn from the model available for *N. ceranae* (Chen and Huang 2010). Figure 4 shows the

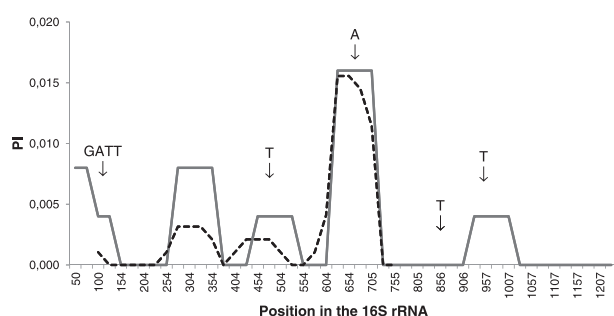


Figure 3 Variation of the Polymorphism Index (PI, y-axis) along the sequence of the 16S rRNA gene, excluding gaps (x-axis). Full line: SSU sequences; discontinuous line: cDNAs. The positions of the polymorphic indels are indicated with arrows.

overview of the complete SSU secondary structure and details the helices where polymorphic sites were detected. The localization of the polymorphic sites in the 16S rRNA structure and the putative functions of the correspondent regions are summarized in Table 1.

DISCUSSION

As in most organisms, ribosomal genes are repeated in the genomes of Microsporidia. In *E. cuniculi*, despite its reduced genome size, rDNA clusters are located near the telomeres of the chromosomes (Brugère et al. 2000). In *N. apis*, there are at least three repeated array copies of rDNA (Gatehouse and Malone 1998), but the number of rRNA genes in the genomes of both *N. apis* and *N. ceranae* is still to be precisely calculated. The heterogeneity of rDNA copies in the same genome has been known since the genome project of *N. ceranae*: Cornman et al. (2009) reported that, with the assembly algorithms currently used, it was impossible to achieve the complete sequence of the rDNA due to its variability. On the other hand, Sagastume et al. (2011) showed that the sequence diversity of rDNA in this species is very high, especially in the IGS but also in the first 600 bp analysed from the 16S rRNA gene, where some SNPs and INDELs appear systematically in clones from isolates geographically very distant. The data also indicated that recombination was generating new variants.

After comparing five complete sequences of the 16S rRNA gene obtained from the same isolate, we found polymorphic sites from nucleotide #46 to #970 from a total length of about 1259 bp. The approach to the variability in expressed 16S rRNA was focused on the segment of 750 bp (ranging from nucleotide 52–801). This fragment seems to be representative of the whole molecule in terms of variability given their practically identical polymorphism indexes. In addition, the variable regions are the same in both cases and no polymorphisms were observed within extensive sequence domains (Fig. 3). The variations included point substitutions, the number of Thymidines or Adenines in a series, and a GATT tetranucleotide insertion (Fig. 3). Some differences were unique. Given the diver-

sity previously described, this was expected after the analysis of only a small number of sequences; a more complete analysis would most probably reveal additional representatives of such alleles. For instance, the insertion A666 and the deletion T846 were unique here but were also found in clones from different isolates in the 2011 study, and A666 is also present in the GenBank reference sequence obtained by Fries et al. (1996). PCR errors and in vitro recombination can be discarded since in a parallel test carried out under the same experimental conditions, no recombination was observed, and a single point mutation occurred in more than 37,000 nucleotides. Moreover, as stated by Ueno et al. (2007), the changes are systematically located in specific regions that tend to be more variable and do not alter the overall secondary structure; in vitro errors were expected to be randomly distributed, irrespective of the in vivo relevance of a given region.

The ribosomal RNAs have been the subject of thorough analyses. Although 16S secondary structure of *N. ceranae* has already been described (Chen and Huang 2010), no studies have been carried out to analyse the consequences of mutations in the rRNA sequence, nor the specific role of each area of the secondary structure. Two- and three-dimensional models of *E. coli* rRNA are currently being used for comparison and reference to a wide range of organisms. Indeed, a number of constant features are maintained among very different organisms (Woese et al. 1983). Microsporidia, such as *Nosema*, have reduced genomes and, correspondingly, the SSU rRNA is also much smaller than in "classic" eukaryotes. Relative to *E. coli*, some helices are missing but the general structure is equivalent (<http://www.rna.ccbb.utexas.edu>).

From the 19 substitutions found, 12 were located in double stranded conformation areas (ds) of the secondary structure, and 7 involved in single stranded loops (ss) (Table 1). All but one "ds-mutations" produced a weaker joint with their complementary bases. The exception is G662A, which changes a G-U pair to A-U (which appeared in 29% of the sequences of this study) and is located in a region of high variability (Fig. 4). It corresponds to helix 26 in *E. coli* (h26) which, according to Woese et al. (1983), has an unusually high frequency of contiguous G-U pairs. While mutations G659A, G662A and G678A in *N. ceranae* seem to maintain those contiguous noncanonical base pairs, C661G weakens the helix, changing G-U pair to C-U (Fig. 4). The terminal bulge next to h26 is one of the only two structural differences between *N. ceranae* and *N. apis* (Chen and Huang 2010), and house the mutation A668G. This change was detected in 46% of the sequences analysed, appearing systematically throughout the different trials, in different years, carried out in our laboratory. No mutations in h26 have been described in *E. coli* and, at present, we cannot shed light on the meaning of this polymorphism, but its recurrence strongly suggests a possible functional relevance.

The different indels spread along the secondary structure were all in single stranded conformation areas. Four are single nucleotide indels that vary the number of Thymidine or Adenosine in a series. The GATT tetranucleotide

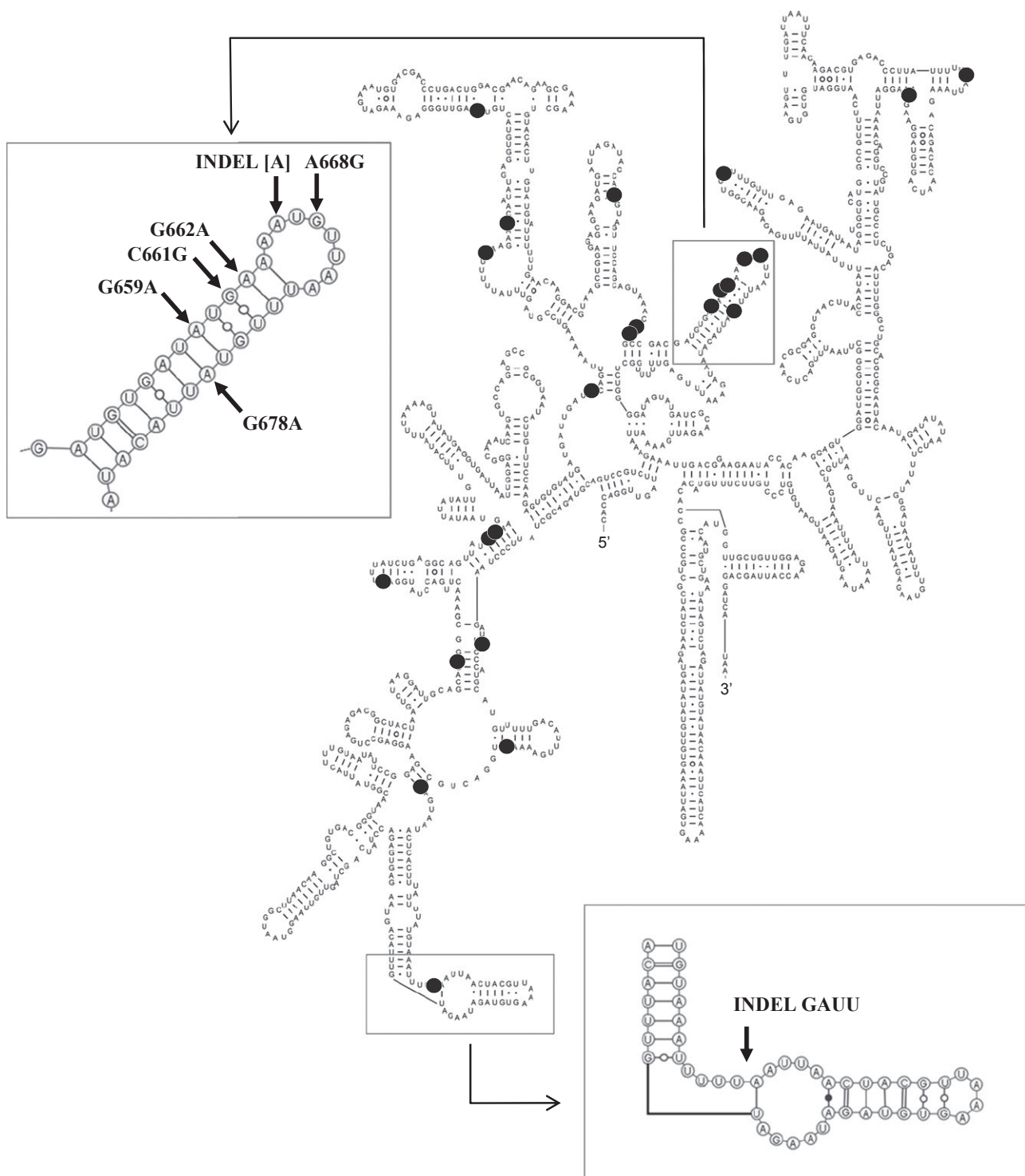


Figure 4 Secondary structure of the 16S rRNA of *Nosema ceranae*. The dark circles denote the polymorphic positions detected. Enlarged areas (boxed) correspond to the highest variable regions: G-U zone and GAUU indel region. The variable points were named according with the global alignment position.

indel is especially interesting. The insertion was present in five of the haplotypes described here, and was also found in around 30% of the isolates of *N. ceranae* from very dif-

ferent origins as far apart as Spain, Central Europe, Kyrgyzstan in Asia (Sagastume et al. 2011) and even Australia (unpublished results), suggesting a hypothetical

Table 1. Summary of *Nosema ceranae* 16S rRNA mutations and insertion-deletions, with the correspondent location in single (ss) or double (ds) stranded conformation of the secondary structure, remarking the changes produced in double stranded pair bases, and main known characteristics of each area. The mutations are numbered relative to the positions in the alignment

Variable sites	Structural location	Structural characteristics
G46A	ss	Mildly deleterious mutation in <i>Escherichia coli</i> *
G74A	ds: changing U-A to U-G	–
G85A	ss	–
GATT indel 117	ss	Elbow connecting h8 to the main structure
A288G	ds: changing G-C to A-C	–
C309T	ds: changing U-A to C-A	–
C328G	ds: changing G-C to C-C	–
A329G	ds: changing G-C to A-C	–
A446G	ss	–
T indel 475	ss: polyT zone	–
G480A	ds: changing A-U to G-U	–
C499T	ss	–
C622T	ds: changing A-U to A-C	–
C642T	ss	–
T647C	ds: changing C-G to U-G	Highly variable G-U zone
G659A	ds: changing A-U to G-U	Highly variable G-U zone
C661G	ds: changing G-U to C-U	Highly variable G-U zone
G662A	ds: changing G-U to A-U	Highly variable G-U zone
A indel 666	ss: polyA zone	Different loop in <i>Nosema ceranae</i> and <i>Nosema apis</i>
A668G	ss	Different loop in <i>N. ceranae</i> and <i>N. apis</i>
G678A	ds: changing U-A to U-G	Highly variable G-U zone
T indel 846	ss: polyT zone	–
T indel 939	ss: polyT zone	Different loop in <i>N. ceranae</i> and <i>N. apis</i>
A970G	ss	Moderately deleterious mutation in <i>E. coli</i> *

*After Yassin et al. (2005).

adaptive significance for the GATT polymorphism. In the secondary structure of the 16S RNA (Fig. 4), it is located in the single stranded elbow between helices h7 and h8 (*E. coli* nomenclature). Helix 8 plays important roles in *E. coli* and mutations have been described as missense and nonsense suppressors (McClory et al. 2010). *E. coli* h8 interacts with h14 near the EF-Tu binding site (McClory et al. 2010) which possibly has a direct role during the decoding process (Villa et al. 2009). Both helices h8 and h14 also interact with 50S subunit to form bridge B8 (McClory et al. 2011). In *N. ceranae*, no variability was found in the equivalent to h8, but the adjacent GATT indel modifies the length of the elbow which hypothetically could influence the capability of movement of h8. The fact that this polymorphism has been maintained worldwide, suggests some functional role.

Only two of the 19 mutations found have been demonstrated to have functional consequences: G46A and

A970G. In 2005, Yassin et al. (2005) catalogued the equivalent positions in *E. coli* (positions 51 and 1181, respectively). The first is a “mildly deleterious mutation clustered in a region of less obvious functional significance”, and the second a “moderately deleterious mutation located in an area substantially far from the known functional centers that occupy the interface side”. In *N. ceranae*, the two mutations appeared in just one clone from the genomic DNA study and was not detected in the cDNA clones nor in previous studies. At present there is no information on the rest of the polymorphic points described here.

Intraspecific genetic variability has been described in a number of Microsporidia, such as the *Encephalitozoon* species, where different genotypes are associated to preferences for different hosts (Ghosh and Weiss 2009). In *E. hellem*, different isolates of human origin showed variable rates of in vitro proliferation (Haro et al. 2006). In all these cases, a given strain proved to be genetically uniform. By contrast, intrastrain diversity exists in *N. bomby* (O'Mahony et al. 2007), *N. apis* (Gatehouse and Malone 1998), *N. bombycis* (Liu et al. 2013) and *N. ceranae* (Sagastume et al. 2011). In this latter case, as in the algae *P. wickerhamii* (Ueno et al. 2007), it has been shown that new variants are originated by recombination of different sequences. To our experience, no matter how selected, purified and diluted an isolate of *N. ceranae* is, uniform sequences cannot be obtained, unless cloned. Therefore, the heterogeneity of certain domains is a characteristic feature of this microsporidian.

Different SSU genes in the same genome have been reported in different organisms including eubacteria (Ueda et al. 1999), archaeobacteria (Mylvaganam and Dennis 1992), *Cryptosporidium parvum* (Rooney 2004), *P. berghei* (Gunderson et al. 1987; Nishimoto et al. 2008), the micro-alga *P. wickerhamii* (Ueno et al. 2007) and even flatworms (Carranza et al. 1999). In all of them, the different variants of SSU have been demonstrated to be expressed, although whether or not they actually have different functional roles is still an open question.

Van Spaendonk et al. (2001) showed that, under experimental conditions, the different ribosomes of *P. berghei* were equally functional. In the cases above, the polymorphic sites are located in positions that do not affect the general structure of the SSU. Although some segments have more constraints than others, ribosomal genes are still highly conserved. Different rates of evolution have been observed for the duplicates of ribosomal genes (Carranza et al. 1999; Mylvaganam and Dennis 1992; Ueda et al. 1999) indicating positive selection, so it could also be suggested that each sequence is adapted to a somehow different function or to different environmental conditions. It is important to emphasize that if two ribosomal variants behave identically under a given set of experimental conditions, it does not imply the same result would be obtained in any environment.

N. ceranae possesses a considerable range of different rRNA sequences, which can be obtained from any isolate, from any geographical origin, and also from a single infected honeybee. This is remarkable considering that the

genomes of Microsporidia are typically compacted and have lost large amounts of genes in adaptation to their strict parasitic life. Further studies need to examine why concerted evolution of rDNA is not occurring here, and whether the ribosomal diversity is related with the shockingly fast worldwide invasion of honeybee colonies by *N. ceranae*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INIA-FEDER (RTA2009-057 and RTA2009-00105-C02-01) and INCRECYT-FEDER funds. We would like to thank to V. Albendea, T. Corrales, C. Abascal and C. Rogerio for technical help. The authors are also indebted to Brian Crilly for his helpful revision of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. E., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. & Spiegel, F. W. 2012. The Revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59:429–493.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De la Rúa, P., Meana, A. & Higes, M. 2012. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res. Vet. Sci.*, 93:150–155.
- Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., Williams, T., Firth, D. R., Skowronski, E., Lehmann, M. M., Bilimoria, S. L., Gress, J., Wanner, K. W. & Cramer Jr, R. A. 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE*, 5(10): e13181.
- Brugère, J. F., Cornillot, E., Méténier, G., Bensimon, A. & Vivarès, C. P. 2000. *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 28:2026–2033.
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M. & Gabaldón, T. 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.*, 10:47.
- Carranza, S., Bagnà, J. & Riutort, M. 1999. Origin and evolution of paralogous rRNA gene clusters within the flatworm family Dugesidae (Platyhelminthes, Tricladida). *J. Mol. Evol.*, 49:250–259.
- Chen, Y. P. & Huang, Z. Y. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*, 41:364–374.
- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I., Evans, J. D. 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog.*, 5(6):e1000466.
- Darty, K., Denise, A. & Ponty, Y. 2009. VARNA: interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25:1974–1975.
- Eickbush, T. H. & Eickbush, D. G. 2007. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175:477–485.
- Eischen, F. A., Graham, R. H. & Rivera, R. 2012. Impact of *Nosema ceranae* on honey bee colonies: A 14 month study. In: Proceedings of the 2012 American Bee Research Conference: 7–8 February 2012; Greenbelt MD.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.*, 103(Suppl 1):S73–S79.
- Fries, I. M., Feng, F., da Silva, A. J., Slemenda, S. B. & Pieniazek, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.*, 32:356–365.
- Gatehouse, H. S. & Malone, L. A. 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:97–105.
- Ghosh, K. & Weiss, L. M. 2009. Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2009:926521.
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P. & McCutchan, T. F. 1987. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, 238:933–937.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41:95–98.
- Haro, M., Del Águila, C., Fenoy, C. & Henriques-Gil, N. 2006. Variability in Infection Efficiency In Vitro of Different Strains of the Microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53:46–48.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. & Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.*, 92:93–95.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido Bailón, E., González-Porto, A. V., Barrios, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., García Palencia, P. & Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.*, 10:2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M. J., Mayo, R. & Bernal, J. L. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.*, 1:110–113.
- Higes, M., García-Palencia, P., Botías, C., Meana, A. & Martín-Hernández, R. 2010. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2:745–748.
- Huang, W., Jiang, H., Chen, Y. & Wang, C. 2006. A *Nosema ceranae* isolate from honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38:1–8.
- Ironside, J. E. 2007. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evol. Biol.*, 7:48.
- Judo, M. S. B., Wedel, A. B. & Wilson, C. 1998. Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Res.*, 26:1819–1825.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Winkler, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. & Vivares, C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414:450–453.
- Keeling, P. J. & Corradi, N. 2011. Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence*, 2:67–70.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. & Paxton, R. J.

2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96:1–10.
- Lahr, D. J. G. & Katz, L. A. 2009. Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *Biotechniques*, 47:857–866.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes III, E. J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J. & Heitman, J. 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.*, 18:1675–1679.
- Liu, H., Pan, G., Luo, B., Li, T., Yang, Q., Vossbrinck, C. R., Debrunner-Vossbrinck, B. A. & Zhou, Z. 2013. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. *J. Invertebr. Pathol.*, 113:63–69.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451–1452.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E. & Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:6331–6338.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C. & Higes, M. 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.*, 109:605–612.
- McClory, S. P., Devarak, A., Qin, D., Leisring, J. M. & Fredrick, K. 2011. Mutations in 16S rRNA that decrease the fidelity of translation. In: Rodnina, M. V., Wintermeyer, W. & Green, R. (ed.). *Ribosomes: Structure, Function and Dynamics*. Springer-Verlag, Wien. p. 237–247.
- McClory, S. P., Leisring, J. M., Qin, D. & Fredrick, K. 2010. Missense suppressor mutations in 16S rRNA reveal the importance of helices h8 and h14 in aminoacyl-tRNA selection. *RNA*, 16:1925–1934.
- Meyerhans, A., Vartanian, J. P. & Wain-Hobson, S. 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res.*, 18:1687–1691.
- Mylvaganam, S. & Dennis, P. P. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics*, 130:399–410.
- Nishimoto, Y., Arisue, N., Kawai, S., Escalante, A. A., Horii, T., Tanabe, K. & Hashimoto, T. 2008. Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 47:45–53.
- O'Mahony, E. M., Tay, W. T. & Paxton, R. J. 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54:103–109.
- Pillet, L., Fontaine, D. & Pawlowski, J. 2012. Intra-genomic ribosomal RNA polymorphism and morphological variation in *Elphidium macellum* suggests inter-specific hybridization in foraminifera. *PLoS ONE*, 7:e32373.
- Rooney, A. P. 2004. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans. *Mol. Biol. Evol.*, 21:1704–1711.
- Rooney, A. P. & Ward, T. J. 2005. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102:5084–5089.
- Sagastume, S., del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. & Henriques-Gil, N. 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honey bees. *Environ. Microbiol.*, 13:84–95.
- Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. 2009. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, 461:1234–1242.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673–4680.
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. & Kataoka, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.*, 181:78–82.
- Ueno, R., Huss, V. A., Urano, N. & Watabe, S. 2007. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single *Prototheca* strain. *Microbiology*, 153:3879–3893.
- Villa, E., Sengupta, J., Trabuco, L. G., LeBarron, J., Baxter, W. T., Shaikh, T. R., Grassucci, R. A., Nissen, P., Ehrenberg, M., Schulten, K. & Frank, J. 2009. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106:1063–1068.
- Van Spaendonk, R. M., Ramesar, J., van Wigcheren, A., Eling, W., Beetsma, A. L., van Gemert, G. J., Hooghof, J., Janse, C. J. & Waters, A. P. 2001. Functional equivalence of structurally distinct ribosomes in the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *J. Biol. Chem.*, 276:22638–22647.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. & Noller, H. F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, 47:621–669.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G. S., Moura, H., Didier, E. S. & Lal, A. A. 2001. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 39:2248–2253.
- Yassin, A., Fredrick, K. & Mankin, A. S. 2005. Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102:16620–16625.

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Capítulo IV

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

**Diversidad genotípica en *Nosema ceranae*,
parásito de la abeja de la miel:
¿aislados formados por múltiples cepas,
procesos sexuales ocultos o ambos casos?**

Soledad Sagastume, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes y Nuno Henriques-Gil

Nosema ceranae es un microsporidio binucleado que infecta a la abeja de la miel. De manera natural parasita la abeja asiática *Apis cerana* pero en la última década se ha encontrado también en la abeja occidental *A. mellifera*. *N. ceranae* está considerado el mayor responsable del fenómeno actual de pérdida masiva de colonias de abejas, con el daño severo tanto económico como ecológico que éste conlleva.

Cinco genes de supuesta copia única fueron analizados en aislados de *N. ceranae* provenientes de Europa y Australia. En los resultados se detectaron diferentes polimorfismos bialélicos en varios puntos específicos a lo largo de los cinco marcadores. Por otra parte, casi todos los aislados no son cepas uniformes, sino que realmente corresponden a poblaciones de células genotípicamente diferentes, ya que sistemáticamente se obtienen secuencias solapadas en sus cromatogramas. El análisis de distintos clones demuestra que se generan nuevos haplotipos por recombinación homóloga en lo que parece ser un ciclo sexual oculto aún sin describir; además, este estudio revela que cada abeja individual puede estar infectada por un conjunto de diferentes cepas de *N. ceranae*.

No hay alelos específicos asociados a Australia o Europa, y tampoco existen diferencias entre aislados de colonias de ambos hospedadores, *A. cerana* y *A. mellifera*, dejando clara la falta de barreras biológicas en la transmisión de *N. ceranae*. La diversidad es elevada para cualquiera de estos orígenes, siendo significativamente mayor en Australia en comparación con los aislados europeos; sin embargo, el grado de heterocigosis es más alto en Europa lo cual puede, hipotéticamente, ser el factor del incremento de la virulencia observada en *N. ceranae* parasitando a *A. mellifera*.

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Genotype diversity in *Nosema ceranae*, parasite of honeybees: Multi-strain isolates, cryptic sex or both?

Soledad Sagastume¹, Raquel Martín-Hernández^{1,2}, Mariano Higes¹ and Nuno Henriques-Gil³

(1) Centro Apícola Regional, Bee Pathology Laboratory, 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain.

(2) Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Parque Científico de Albacete, Spain.

(3) Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina, Universidad CEU San Pablo, Campus de Montepríncipe, 28668 Madrid, Spain.

Abstract

Nosema ceranae is a binucleated microsporidium that infects honeybees. It seems to be a natural parasite of the Eastern honeybee *Apis cerana* and, in the last decade, it invaded the Western honeybee *A. mellifera*. *N. ceranae* is considered to be a major cause of the massive colony losses of honeybees, with severe economic and ecological damage. Given the unreliability of ribosomal genes for phylogenetic approaches in *N. ceranae* previously demonstrated, five putatively single-copy genes were analyzed in European and Australian isolates of the parasite. Different biallelic polymorphisms were detected at a number of specific points, for all of those markers. Moreover, as overlapping sequences are systematically obtained, almost all of the isolates, rather than being uniform strains, actually correspond to populations of genotypically different cells. The analysis of different clones demonstrates that new haplotypes are generated by homologous recombination in what appears to be a cryptic sex cycle yet to be described; additionally, it also reveals that individual honeybees may be infected by a pool of different strains of *N. ceranae*. There are no diagnostic alleles associated with Australian or European origins, nor are there differences between the two hosts, *A.*

cerana and *A. mellifera*, thus supporting the absence of biological barriers for *N. ceranae* transmission. The diversity is high for both those origins, Australian isolates being significantly higher compared to European ones; however heterozygosity is higher in Europe, which could hypothetically be a factor in increasing the observed virulence of *N. ceranae* to *A. mellifera*.

Introduction

Microsporidia are obligate intracellular parasites classified in the fungi Phylum (Lee et al., 2008; Adl et al., 2012). Unicellular and eukaryote, these spore parasites lack some cellular organelles and show a strong genome reduction (Keeling et al., 2002). More than a half of known Microsporidia genera possess diplokaryotic nuclear apparatus, at least at some stages during their life cycle. The diplokaryon consists of two apposed nuclei in a coffee bean-association which are supposed to be identical and divide synchronously (Vávra, 1976). Different life cycles have been studied for many years time describing Microsporidia as asexual organisms although from time to time evidences of meiosis were reported in some species (Loubès et al., 1976; Loubès, 1979; Hazard and Brookbank, 1984; Chen and Barr, 1995). This phenomenon has been subject to a long debate, and while it was classified as an occasional event, different lines of evidence keep suggesting the existence of hidden sexual stages (Sprague et al., 1992). In fact, in recent years increasing studies have suggested sexual reproduction in various species (Nassonova et al., 2005; Ironside, 2007; Lee et al., 2008; Dyer, 2008; Malik et al., 2008; Lee et al., 2009, 2010; Sagastume et al., 2011, Krebes et al., 2014).

Nosema ceranae is a putatively sexual microsporidium (Sagastume et al., 2011), natural parasite of the Eastern honeybee *Apis cerana* (Fries et al., 1996). In the last decade it has gained importance due to its presence in a new host *Apis mellifera*, the European honeybee (Higes et al. 2006; Huang et al., 2007), which has suffered a dramatic colony

collapse phenomenon around the world. This exotic microsporidian (Martín-Hernández et al., 2012; Botías et al., 2012a) colonizes the gut epithelium of the bee, as well as of its closely related species *Nosema apis*, but is more pathogenic and produces very different symptoms at colony level (Higes et al., 2008a, 2009a,b, 2010a, 2013; Botías et al., 2013; Villa et al., 2013; Goblirsch et al., 2013). Inside the individual host, the life cycle of *N. ceranae* is completed in only 3 days (Higes et al., 2007) when the new mature infective spores are ready to be released outward. Since the first detection in *Apis mellifera* in Europe (Higes et al., 2006), *N. ceranae* has been detected in colonies worldwide (revised by Fries, 2010, and Higes et al., 2010b) with no conclusive evidences about exactly how long *N. ceranae* has been present in *A. mellifera*. A large number of studies suggest that the parasite is originally from Asian honeybees and has been recently expanded worldwide (Higes et al., 2006; Fries et al., 2006; Klee et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; Cornman et al., 2009; Giersch et al., 2009; Botías et al., 2012a,b; Roudel et al., 2013; Gómez-Moracho et al., 2013). Following this hypothesis, the genetic variability among *N. ceranae* populations could show signs of its ongoing spread out of Asia, such as a higher diversity in Eastern populations, local bottlenecks and so on. On the other hand, why *N. ceranae* has been reported to be much more aggressive to honeybees than *N. apis* in some Mediterranean areas is still an open question.

In recent years the search for genetic markers useful in phylogeny studies and strain determination related to the different virulence grades of the parasite, has become more difficult than initially suspected. The first choice for a genetic marker is usually the ribosomal genes and spacers (rDNA), but as seen in other species of Microsporidia, these gene clusters are not only repeated but are also variable (Gatehouse and Malone, 1998; Tay et al., 2005; O'Mahony et al., 2007; Ironside, 2013) which compromise the genotyping. The small subunit (SSU) and the intergenic spacer (IGS) of *N. ceranae* show a high polymorphism, and recombination creates new variants (Sagastume et al., 2011). Indeed, the ribosomal genes were not included in the genome assembly of *N. ceranae* (Cornman et al., 2009) and have produced non-concordant results, and different phylogenetic attempts have been incongruent.

High intraspecific variability in reduced genomes, with no signs of concert evolution and evidences of sexuality, found in worldwide samples, complicate phylogenetic studies of isolates from different colonies, assuming that all the cells of each isolate are genetically

identical (Sagastume et al., 2011). However, despite the difficulty for phylogenetic studies, the high variability also raises new relevant hypotheses about the life cycle of *N. ceranae*: the identity of the two haploid nuclei is now being questioned, and the existence of different strains within each *N. ceranae* isolate representing genetically diverse populations is also under suspicion. How and why there is permanent high variability in *N. ceranae* is also to be explained.

Considering these facts, our first goal was to obtain single-copy markers useful for strain determination. Secondly, single-copy markers contrasted to multi-copy, such as rDNA, should shed light on the intraspecific variability and recombination, as the latter may create new alleles after unequal sister chromatic exchanges (Sagastume et al., 2011). Finally, the assessment of the variability levels in *N. ceranae* populations and localities is essential to understanding the adaptability of this microsporidium.

In our approach to these objectives, we analyzed five randomly selected fragments of DNA available after the *N. ceranae* genome project (Cornman et al., 2009), which are supposed to be unique genes and more conserved than ribosomal DNA, in different isolates from Europe, Asia and Australia.

Material and methods

The microsporidium *Nosema ceranae* was analyzed from 30 biological samples, including the Western honeybee, *Apis mellifera* (24), the Eastern honeybee, *A. cerana* (5) plus one regurgitated pellet with *N. ceranae* spores from the bee-eater, *Merops apiaster*. The samples and locations are given in Table 1. Total DNA was extracted following the method described by Martín-Hernández et al. (2007). Polymerase Chains Reactions (PCR) were performed to amplify 5 different fragments of randomly selected coding regions of *N. ceranae*, which are supposed to be single-copy loci. The GenBank references are shown in Table 2. All PCRs started with 0.5 µL of template DNA, 0.4 µM of each nucleotide, 10 pmol of each primer, 1.5 U of Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, cat. no.11509-015), its 10x buffer, 25 nmol MgCl₂, 12 µg of BSA (Roche Diagnostic, cat. no. 10711454001) and sterilized distilled water up to a final volume of 25 µL. PCRs were performed in a Eppendorf Mastercycler EpGradient S and Pro S thermocyclers with the following program: 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, primer-specific annealing temperature for 30 s, 68°C for 60s (for products under 1000 bp) or 90 s (for products over 1000 bp), and finally a

single step of 68°C for 7 min. The five different primer pairs, their sequences, the PCR product sizes and the correspondent annealing temperatures are also shown in Table 2. The PCR products were kept at 4°C and 5 µL of each were resolved in standard 2% Agarose gel (Invitrogen E-GEL 2% Agarose GP, cat. no. G8008-02) and visualized by Ethidium Bromide staining. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, cat. no. 28104) before sequencing in both directions at Unidad de Biología Molecular Universidad de Alcalá de Henares using the same PCR primers (Table 2).

In order to ensure that the variability found in PCR products actually corresponds to different genomic DNA templates, the products of amplification of 3 variable X639 fragments were selected (SpTF, Sp402 and Sp1103) and cloned in *Escherichia coli* plasmid pCR2.1-TOPO® with TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, cat no. K4500-01). The plasmid DNA was extracted from randomly selected clones and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, cat no. 27106). A volume of 5 µL of plasmid was digested with *EcoRI* (New England Biolabs, R0101S) and separated in 1% agarose gel electrophoresis in order to check the correct size of the insert. A total of 38 clones were obtained (14, 6 and 18, respectively) and sequenced independently as described above. Additionally, the absence of recombination processes during the PCR amplification was tested as described by Sagastume et al (2014); briefly, two clones differing in 6 bp along the sequence were mixed, amplified with Platinum *Taq* polymerase, and the products were sequenced using the M13 commercial primers; all sequences matched one of the two templates and no recombinants were detected.

All chromatograms were carefully revised visually and double-peaks were noted as single nucleotide polymorphisms (SNPs) and named with the code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code). The sequences obtained were aligned following the CLUSTAL W algorithm (Thompson et al., 1994), and analyzed and translated into protein sequences with the program BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall, 1999). For an easier study of the polymorphic points, common conserved areas were removed manually from the general alignments. The population allele frequencies p_i for a given variable site i was calculated assuming that double peak isolates were heterozygous and those with a "clean" peak in the chromatogram were homozygous. The diversity for a site i with j alleles was estimated by $D_i = 1 - \sum p_{ij}^2$, and heterozygosity as the number of isolates with a double peak at

the site i divided by the total number of isolates. The rates of synonymous (K_s) and non-synonymous substitutions (K_a) were calculated with the DNAsp 5.10 program (Librado and Rozas, 2009). Sequence logo graphical representations were created with WEBLOGO 2.8.2 program (Crooks et al., 2004).

Results

The sequences obtained for the five markers analyzed were mostly identical to their correspondent GenBank references, but all of them showed some point differences, as given in Figure 1. The complete alignment can be seen at the GenBank references KJ544353-KJ544382, KJ544383-KJ544412, KJ544413-KJ544442, KJ544443-KJ544472, and KJ544473-KJ544502 for X580, X639, X696, X754, and X802 sequences respectively. In the case of the X580 marker there were 7 additional point differences plus a 3 bp indel compared to the reference sequence; however, all of our sequences were identical so those points were omitted from Figure 1.

Only one isolate (A7, obtained from *Apis cerana* of Australia) had all the sequences entirely free from indeterminations and this was used for further comparisons. By contrast, unexpected nucleotide heterogeneity at certain points was found for all five markers, exhibiting double peaks in the direct sequencing chromatograms. The different isolates showed 2 to 31 indeterminations. The genotypes of the different isolates consisted in point substitutions plus the correspondent mixed or heterozygote. For instance, in the case of X580, the variable sites were GTAAAC in A7, and AATGGC in A12, while A19 showed RWWRRRC, since the sequencing systematically revealed clear double peaks at the first five sites.

This heterogeneity is unexpected for a putatively clonal organism, so we performed an experiment to ensure that the double peaks corresponded to different DNA templates actually existing in the isolates of *N. ceranae*. Thus, the original amplification products of three isolates (SpTF, Sp402 and Sp1103) were each cloned in *E. coli* plasmids and several clones were sequenced. The corresponding haplotypes are at GenBank accessions KM04204 to KM042056. No double peaks appeared in any case and, indeed, the different clones included each of the variants that composed the genotype; for example, after an R in the original sequencing, some clones showed an A and other showed a G (Fig. 2). So, overlapping peaks are not artifacts but rather reflect the existence of more than one alternative sequence in each

isolate. Likewise, in the other validation experiment, performed as described by Sagastume et al. (2014), all the PCR products cloned fitted to one of the two haplotypes used as templates, demonstrating that in the conditions essayed during the PCR amplification there is no *in vitro* recombination, so artifactual haplotypes are not created.

However, 3 sequences obtained from the 38 clones did not match to any of the possible variants predicted from the original sample. That is, in points where no indeterminations existed, such clones showed different nucleotides (Fig. 2). The possibility of artifacts due to clone contamination was discarded and, although replication errors in the first PCR could be suggested, it is important to note that those variants are not random but, instead, do exist in samples apart. In fact, two of these clones fit exactly to a different genotype (11). Therefore, it seems that in addition to the main types explained by a heterozygous *N. ceranae* strain, minority infection by genetically different strains also coexist.

All variations were biallelic, that is, only two alternative nucleotides could be found for a given site, plus the correspondent mixed or heterozygous genotype. As expected, the frequency of A/G transitions is similar to that of C/T (18 and 15 from the total 46 SNP), as a given transition in one DNA strand implies the complementary in the other. But surprisingly, no G/C (S) transversions were observed, contrasting with the 9 A/T (W) transversion polymorphic sites; it seems that, for some unknown reason, *N. ceranae* is much more prone to weak transversions than to those in strong base pairs. Table 3 shows the number of variable sites, and polymorphisms per site. All possible allelic variants were translated to the correspondent aminoacid sequence using DNAsp program; the number of synonymous and non-synonymous changes, plus the ratio between the polymorphism in non-synonymous and that in synonymous sites are also given in Table 3; two loci (X580 and X802) exhibited only non-synonymous changes, in X639 there was an excess of synonymous substitutions, while the proportion Ka/Ks was compatible with a neutral model.

Half of the isolates of *N. ceranae* in this study were obtained in six different European countries, from infected honeybees, *Apis mellifera* (one isolate, S807, was extracted from the bee regurgitated pellets of a bee-eater); the other half were Australian isolates, either from the Western honeybee or from the Eastern honeybee, *A. cerana*. Except for some trivial cases where an allele or genotype is found in one single sample, most

variants in *N. ceranae* could originate anywhere. Reciprocally, a common origin may be associated to different genotypes. Table 4 shows the number of different genotypes found for each sequence, and the correspondent mean diversity and heterozygosity. There are no apparent differences when the Australian isolates from *A. cerana* are compared to *A. mellifera*, suggesting a free transmission of the microsporidian from one host to the other, so for further comparisons the two origins were pooled together.

The diversities per site were also similar when comparing European against Australian isolates (Fig. 3), however, more dissimilar genotypes were detected in the latter (the mean numbers of genotypes were, respectively, 2.8 and 6.6; $t=3.62$, d.f.=8, $p<0.01$). Identical genotypes are often found among European samples, not only for a specific marker but also when considering the five markers: for instance the genotype 5-11-3-5-3 was obtained from an isolate from Switzerland, another from Slovakia and a third from Spain (Fig. 1), whereas in Australia no pair of isolates shared a same genotype. As illustrated in Figure 5, for most sites along the markers analyzed, the European population is dominated by heterozygotes, while the different genotypes (each of the two alternative nucleotides plus the heterozygote) are more balanced in Australia.

Discussion

Outbreaks of parasites are typically produced by specific virulent strains. Many parasitic microorganisms reproduce fast in an asexual manner, and even for those species where a sexual cycle is possible, clonal reproduction is often the best option in the interest of the parasite (Ayala, 1998). Consequently, defined genotypes should be identified in a given infection, and their approximate similarity to other genotypes should allow epidemiological relationships to be established, with the clear objective precluding further invasions. Concerning Microsporidia, this is indeed the picture for *Encephalitozoon* species and *Enterocytozoon bieneusi*: among strain diversity contrasts with uniform genotypes obtained from specific isolates (see, for instance, Haro et al., 2005, Galván et al. 2013, 2014). However, this is not the case in species of *Nosema*. Genetic evidence clearly supports the existence of cryptic sex in *N. granulosis* (Krebes et al. 2014). In a previous work, we have demonstrated that in *N. ceranae* rDNA varies within a given isolate, and recombination may occur, hypothetically either between the

different repeats of rDNA clusters in sister chromatid exchanges or in a cryptic sexual cycle (Sagastume et al. 2011). In either case, phylogenetic approaches based on rDNA sequences become invalidated. In order to discard the possibility of exchanges between tandemly repeated sequences as a source of genetic variability, we selected five coding sequences from the genome of *N. ceranae* for the present work. The genome is still not completely assembled, so we have no final evidence that those are actually single copy genes, as a number of segments of the microsporidian genomes are dispersedly repeated (Cornman et al., 2009). But keeping in mind that the markers were randomly selected among *N. ceranae* exclusive gene sequences, with about 1000 bp, and not containing microsatellites, the option of single copy seems the most probable.

It is important to emphasize that all five markers analyzed were polymorphic due to single nucleotide changes, ranging from 4 variable sites (along the 875 bp of K802) to as much as 18 (in the 1280 bp of X639; Table 3). The rates of synonymous versus non-synonymous mutations were fairly close to 1 for X696 and X754, suggesting essentially neutral effects, while that rate is clearly biased to synonymous mutations in X639 ($K_a/K_s=0.14$), evidencing purifying selection (that is, most non-synonymous mutations are deleterious and disappear). Roudel et al. (2013) obtained similar results for other nine coding sequences of *N. ceranae*. By contrast, for the other two markers, X580 and X802, all the polymorphisms detected lead to changes in the correspondent polypeptide; this strongly suggests directional selection, and hence a possible adaptive role for these polymorphisms.

The genotyping of the different isolates of *N. ceranae* systematically produced ambiguous results as two alternative nucleotides exist for a number of points. We should emphasize that this is not a technical artifact. First, the indeterminations occur for very specific nucleotides: all along the fragments analyzed, the chromatograms are clear with a single peak for each position, while those positions that sometimes exhibit a double peak may also show one or the other variant in a uniform condition. Secondly, cloning and subsequent analysis of different clones demonstrated that the double peaks actually corresponded to alternative DNA templates existing in a given isolate. Thus, the genotyping of *N. ceranae* has to be directed not to obtain a single haplotype, correspondent to a specific pure strain, but rather to a whole-isolate genotype, which can be of mixed heterozygosity.

This heterogeneity can be explained by two different but not exclusive phenomena:

- (1) a given honeybee is infected by two or more strains of *N. ceranae*, so an isolate would include genetically different clones; and
- (2) a given strain of the microsporidian has more than one different genome, that is, it might be heterozygous for a number of markers.

Nosema and *Vairimorpha* genera are binucleated and hence can be considered diploids or, at least, pseudodiploids. Discussion has been focused on whether there is or there is not a phase where a diploid nucleus is formed, followed by meiotic chromosome reduction (Hazard and Brookbank, 1984), and whether the two nuclei could be of different origins if the host cell is infected by two different strains (Sagastume et al. 2011, 2014). Although there are clear evidences that meiosis occurs in *Vairimorpha* species (Ironside, 2007), no microscope observations have so far supported this in *N. ceranae*.

Despite the extensive number of heterozygosity in the genotypes of the isolates, there is consistent evidence that different haplotypes can be formed after recombination between two others. For instance, X580 clean haplotypes were GTAAA and AATGG (Fig. 1), and if both are present in an isolate they will produce the RWWRR genotype, found in a number of isolates; however, AAWRR and GTWRR were also found, indicating that AAAAA and GTTGG must also exist. Additional examples can be obtained from Figure 1.

Moreover, the clones analyzed for X639 provide clearer evidence for recombination. Four clean genotypes were obtained from Australian samples (genotypes 1 y 4; see Figure 1). Genotype 11 the one with more double peaks was selected for cloning; this genotype could correspond to a mix of genotypes 2, 3 and 4 (Fig. 2). The 38 clones sequenced produced 15 different haplotypes: four clones had one of the genotypes 2, 3, or 4, while the other 10 were different recombinants of them. Unexpectedly, two clones had a genotype 1, which apparently did not exist in the original sample, at least in a sufficient amount so as to produce identifiable peaks in the chromas. Thus, direct sequencing from the original isolates reflects the haplotypes existing at considerable frequencies, but minority – yet existing – sequences will not be detected unless many clones are analyzed. Likewise, after the analysis of a series of clones, Roudel et al. (2103) concluded that the true allelic richness was most probably underestimated.

In summary, our results indicate that honeybees are often infected not by a pure strain of *N. ceranae* but by a heterogeneous group of spores, either because the binucleated spore may be heterozygous in a number of loci, or because different strains

are actually present in the infecting group. Once this population reproduces in the honeybee gut, meiosis will cause allele segregation, and fusion of nuclei of different origin also followed by recombination will produce new genotypes. Therefore, the genetic diversity in *N. ceranae* is maintained or even increased (Fig. 4).

Whatever the mechanisms creating the genotype heterogeneity, the fact that all the isolates except one appeared to be mixed or heterozygous for the different markers, raises a number of fundamental questions. *N. ceranae* is genetically diverse and a sexual cycle must exist, but after the absence of cytological observation it should be assumed that nuclei fusion and meiosis are infrequent. Keeping in mind that millions of spores are clonally produced in a few days, the fact that the diversity is maintained all over the world is baffling.

Half of the isolates of *N. ceranae* in this study were obtained from six different European countries; the other half correspond to Australian isolates, in this case, either from the European honeybee or from the Eastern honeybee. It is clear from Figure 1 that there are no diagnostic alleles related to any of those origins. Except for a few insignificant cases where a variant is found in one single sample, most alleles exist in *N. ceranae* infecting *A. cerana* or *A. mellifera*, from Australia or from Europe. The lack of barriers to the transmission of *N. ceranae* between the two honeybees had already been reported by Fries (1996) and recently by Roudel et al. (2013). Our results indeed point out a free transmission for this microsporidian with no signs of geographical or host segregation. A common origin may be associated to different genotypes and, reciprocally, identical genotypes are found in Australia and Europe.

There is, however, a difference between samples from the two continents with regard to genotype distribution. As shown in Figures 3 and 5, genotype diversity is higher in Australia than in Europe, which is compatible with the probable Eastern origin of *N. ceranae* and a recent invasion into Europe. In any case, it is also clear that European populations are not of unique origin followed by clonal spreading, as a number of very different genotypes indeed exist. Unpredictable though, heterozygosis or mixed genotypes do not parallel the diversity: the mean proportion of heterozygous samples is higher in Europe. Although new experiments have to be conducted, this finding again supports an adaptive role for the polymorphic nature of the infecting populations of *N. ceranae*. The coexistence of different alleles to any genetic marker is stubbornly maintained all over the world and especially in European isolates; perhaps, as has also been suggested

for *N. bombycis* (Pan et al. 2013), it is precisely such heterogeneity that makes a group of *N. ceranae* spores so virulent to *Apis mellifera*.

The presence of *N. ceranae* in any region cannot be approached as if they were outbreaks of specific strains. Wherever sampled, *N. ceranae* is diverse revealing lineages of different origins. Like any organism with an opportunity for sexual reproduction, population approaches are needed to understand its peculiar features. It should be remembered that drones may transmit the parasite to many different honeybee colonies, and that *N. ceranae* also infects *Bombus* species (Plischuk et al., 2009; Graystock et al., 2014), increasing its possibilities for spreading. Additionally, it has been demonstrated that this microsporidian can also be transmitted through the pollen (Higes et al., 2008b). Finally, queens are freely imported long-distance to recover honeybee populations in a given region. These factors synergically interact with the phenomena evidenced here – mixed infections and recombination – to create the actual diverse populations of *N. ceranae* infecting many honeybee colonies.

Acknowledgements

This work was supported by Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Consejería de Agricultura) and INIA-FEDER FUNDS (RTA 2009-00057).

We would like to thank V. Albendea, T. Corrales, M.C. Rogerio and M.C. Abascal for technical help, and Dr. Sharon de Wet from the Department of Employment, Economic Development & Innovation of Health & Food Sciences Precinct, Coopers Plains (Australia) for her kindness in sharing with us the Australian samples. The authors are indebted to Brian Crilly for his helpful revision of the manuscript.

References

- Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, et al. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59 (5):429-93.
- Ayala F.J. 1998 Is sex better? Parasites say "no". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3346–3348.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De la Rúa, P., Meana, A., Higes, M. 2012a. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci*. 931: 150-155.

- Botías, C., Anderson, D.L., Meana, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012b. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 108-113.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Higes, M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 44:25.
- Chen, W.J., Barr, A.R., 1995. Chromosomal evidence on the sporogony of *Amblyospora californica* (Microspora: Amblyosporidae) in *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 42,103-108.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., et al. (11 co-authors). 2009. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. *PLoS Pathog.* 5(6):e1000466.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., Brenner, S. E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188-1190.
- Dyer, P.S., 2008. Evolutionary biology: microsporidia sex - a missing link to fungi. *Curr Biol.* 11;18:R1012-2014.
- Fries, I.M., Feng, F., Silva, A.J., Slemenda, S.B., and Pieniazek, N.J. (1996) *Nosema ceranae* n. sp. Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32:356-365.
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M., 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research* 45: 230-233.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol.*, 103 Suppl 1:S73-9. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.017.
- Galván A., Magnet A., Izquierdo F., Fenoy S., Henriques-Gil N., del Aguila C. (2013) Variability in Minimal Genomes: Analysis of Tandem Repeats in the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection, Genetics and Evolution* 20: 26-33.
- Galván A.L., Magnet A., Fenoy S., Henriques-Gil N., Haro M., Ponce Gordo F., Miró G., Águila C., Izquierdo F. (2014) Microsporidia detection and genotyping study of human pathogenic *E. bienersi* in animals from Spain. *PLOS ONE* 9 (3): e92289.
- Gatehouse, H.S., Malone, L.A., 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol.* 71:97-105.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40, 117-123.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* 8(3): e58165. doi:10.1371/journal.pone.0058165
- Gómez-Moracho, T., Maside, X., Martín-Hernández, R., Higes, M., Bartolomé, C., 2013. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology*, 1-7. doi:10.1017/S0031182013001790.
- Graystock, P., Goulson, D., Hughes, W.O.H., 2014. The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ* 2:e522; DOI 10.7717/peerj.522
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andrés I, Alonso F, Fenoy S, del Aguila C. (2005) First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl Environ Microbiol.* 71(6): 3153-3157.
- Hazard, E.I., Brookbank, J.W., 1984. Karyogamy and meiosis in *Amblyospora* sp. (Microspora) in the mosquito *Culex salinarius*. *J. Invertebr. Pathol.* 44, 3-11.
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92: 93-95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., and Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.*, doi:10.1016/j.jip.2006.11.001
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol.*, 10: 2659-69.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A., 2008b. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1): 76-78.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P., and Meana, A., 2009a. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environm Microbiol Rep* 1: 495-498.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., et al., 2009b. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 1:110-113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., et al., 2010a. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol Rep* 2: 243-250.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010b. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41: 375-392.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol*, 1:17-29.
- Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38: 30-37.
- Ironside, J.E., 2007. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evolutionary Biology* 7:48
- Ironside, J.E., 2013. Diversity and recombination of disperse ribosomal DNA and protein coding genes in microsporidia. *PLoS One* 8(2): e55878. doi:10.1371/journal.pone.0055878.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56: 93-116.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., et al. (3 co-autores), 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96(1): 1-10.
- Krebes L., Zeidler L., Frankowski J., Bastrop R. (2014) Patterns of genetic diversity in parasite rDNA and host mitochondrial DNA suggest (cryptic) sex in the putative apomictic microsporidian *Nosema granulosis*. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 259-268.
- Lee, S.C., Corradi, N., Byrnes III, E.J., Torres-Martínez, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* 18:1675-1679.
- Lee, S.C., Weiss, L.M., Heitman, J., 2009. Generation of genetic diversity in microsporidia via sexual reproduction and horizontal gene transfer. *Commun Integr Biol.* 2:1-5.
- Lee, S.C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2010. Evolution of the sex-Related Locus and Genomic Features Shared in Microsporidia and Fungi. *PLoS ONE* 5(5): e10539. Doi: 10.1371/journal.pone.0010539.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Loubès, C., Maurand, J., Rousset-Galangau, V., 1976. Présence de complexes synaptone'matiques dans le cycle biologique de *Gurleya chironomi* Loubès et Maurand, 1975: un argument en faveur d'une sexualité chez les Microsporidies? *C. R. Acad. Sci. Paris* 282,1025-1027.
- Loubès C., 1979. Recherches sur la méiose chez les Microsporidies: conséquences sur les cycles biologiques. *J. Protozool.* 26,200-208.
- Malik, S-B., Pightling, A.W., Stefaniak, L.M., Schurko, A.M., Logsdon, J.M. Jr, 2008. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE.* 3:e2879.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M. 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Env. Microbiology* 73: 6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol.* 14: 2127-38. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.
- Nassonova, E.S., Smirnov, A.V., 2005. Synaptonemal complexes as evidence for meiosis in the life cycle of the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli*. *European Journal of Protistology* 41: 175-181.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T., Paxton, R.J., 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J Eukaryot Microbiol.* 54:103-109.
- Pan, G., Xu, J., Li, T., Xia, Q., Liu, S-L., Zhang, G., Li, S., Li, C., Liu, H., Yang, L., Liu, T., Zhang, X., et al. (21 co-authors), 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics* 2013 14:186. doi:10.1186/1471-2164-14-186
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C., Higes, M., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera, Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emergent pathogen of honey bees (*Apis*

- mellifera). Environmental Microbiology Reports 1: 131-135.
- Roudel, M., Aufauvre, J., Corbara, B., Delbac, F., Blot, N., 2013. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. Parasitology 140: 1346-1356.
- Sagastume, S., del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N., 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honey bees, Environmental Microbiology 13: 84-95.
- Sagastume, S., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N. 2014. Ribosomal Gene Polymorphism in Small Genomes: Analysis of Different 16S rRNA Sequences Expressed in the Honeybee Parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). Journal of Eukaryotic Microbiology 61: 42-50. doi: 10.1111/jeu.12084.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I., 1992. Taxonomy of phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol. 18: 285-395.
- Tay, W.T., O'Mahoney, E. and Paxton, R.J., 2005. Complete rRNA Gene Sequences Reveal that the Microsporidium *Nosema bombi* Infects Diverse Bumblebee (*Bombus* spp.) Hosts and Contains Multiple Polymorphic sites. J. Eukaryot Microbiol., 52(6), 2005 pp. 505-513.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Vávra, J., 1976. Structure of the Microsporidia. In: L.A. Bulla, Jr. and T.C. Cheng (Eds.), Comparative Pathobiology. Vol. 1. Biology of the Microsporidia. Plenum Press, N.Y., London, pp. 1-86.
- Villa, J.D., Bourgeois, A.L., Danka, R.G., 2013. Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. Apidologie, DOI:10.1007/s13592-013-0201-1.

Table 1. Isolates of *Nosema ceranae* analyzed with their correspondent geographical origin, year of sampling and biological source.

<i>Isolate</i>	<i>Location</i>	<i>Year</i>	<i>Biological Source</i>
Sp801	Spain	2005	<i>Apis mellifera</i>
Sp816	Spain	2005	<i>Apis mellifera</i>
Sp889	Spain	2005	<i>Apis mellifera</i>
Sp1103	Spain	2005	<i>Apis mellifera</i>
Sp906	Spain	2006	<i>Apis mellifera</i>
Sp2106	Spain	2006	<i>Apis mellifera</i>
Sp402	Spain	2006	<i>Apis mellifera</i>
Sp610	Spain	2006	<i>Apis mellifera</i>
SpN	Spain	2006	<i>Apis mellifera</i>
SpTF	Spain	2010	<i>Apis mellifera</i>
Sw479	Switzerland	2006	<i>Apis mellifera</i>
G991	Germany	2006	<i>Apis mellifera</i>
F1109	France	2006	<i>Apis mellifera</i>
SLO7	Slovenia	2006	<i>Apis mellifera</i>
Sk807	Slovakia	2008	<i>Merops apiaster</i>
A2	Australia	2006	<i>Apis mellifera</i>
A3	Australia	2006	<i>Apis mellifera</i>
A4	Australia	2006	<i>Apis mellifera</i>
A5	Australia	2008	<i>Apis mellifera</i>
A6	Australia	2008	<i>Apis mellifera</i>
A10	Australia	2010	<i>Apis mellifera</i>
A11	Australia	2010	<i>Apis mellifera</i>
A13	Australia	2004	<i>Apis mellifera</i>
A14	Australia	2005	<i>Apis mellifera</i>
A22	Australia	2010	<i>Apis mellifera</i>
A7	Australia	2009	<i>Apis cerana</i>
A8	Australia	2010	<i>Apis cerana</i>
A12	Australia	2009	<i>Apis cerana</i>
A18	Australia	2010	<i>Apis cerana</i>
A19	Australia	2009	<i>Apis cerana</i>

Table 2. Primers used in PCR and sequencing, PCR annealing temperature, product DNA size and GenBank reference sequences.

<i>Primer</i>	<i>Sequence (5' – 3')</i>	<i>PCR T^a (°C)</i>	<i>Product size (bp)</i>	<i>GenBank reference sequences</i>
X639_UPPER	GTAAAAAAGTGGGATATTCA	55.0	1280	XM_002996639
X639_LOWER	ACAAATCTATCTCTTATCCCT			
X580_UPPER	AAGGGAAATATTAGGCAACTG	56.6	1138	XM_002996580
X580_LOWER	CGGGAAGTTCAATTACACTC			
X802_UPPER	TGCCGAGTGATAAACTTACT	58.0	873	XM_002996802
X802_LOWER	AATCGATATATCTGCGTTCTT			
X754_UPPER	ATGGCTTCTACAATTTACTTA	55.0	1123	XM_002996754
X754_LOWER	AAAACATATTCGTGCACTA			
X696_UPPER	ATTTGAAATTGTCTCCCTATG	55.0	1217	XM_002996696
X696_LOWER	GGAAATTACTTCGTCAACCT			

Table 3. Variable sites for each marker of *N. ceranae*, polymorphisms per site, synonymous and non-synonymous changes, and the ratio between non-synonymous and synonymous rates (Ka/Ks).

	<i>Marker</i>				
	<i>X580</i>	<i>X639</i>	<i>X696</i>	<i>X754</i>	<i>X802</i>
<i>Total sites</i>	1138	1280	1219	1123	875
<i>Variable sites</i>	6	18	9	9	4
<i>Polymorphisms per site</i>	0.0053	0.0141	0.0074	0.0080	0.0046
<i>Synonymous</i>	0	11	2	2	0
<i>Non-synonymous</i>	6	7	7	7	4
<i>Ka/Ks</i>	-	0.14	0.88	0.92	-

Table 4. Polymorphism data for each marker.

	<i>Marker</i>				
	<i>X580</i>	<i>X639</i>	<i>X696</i>	<i>X754</i>	<i>X802</i>
<i>Nº of different genotypes</i>					
<i>Total (n=30)</i>	7	12	8	7	5
<i>Europe</i>					
<i>Total (n=15)</i>	3	2	3	4	1
<i>Australia</i>					
<i>Total (n=15)</i>	6	11	6	6	5
<i>A. cerana (n=5)</i>	4	5	4	4	2
<i>A. mellifera (n=10)</i>	5	8	4	4	5
<i>Mean diversity</i>					
<i>Europe</i>					
<i>Total (n=15)</i>	0.18	0.36	0.21	0.34	0.25
<i>Australia</i>					
<i>Total (n=15)</i>	0.43	0.36	0.21	0.32	0.35
<i>A. cerana (n=5)</i>	0.45	0.39	0.22	0.34	0.24
<i>A. mellifera (n=10)</i>	0.41	0.34	0.21	0.35	0.33
<i>Mean heterozygosis</i>					
<i>Europe</i>					
<i>Total (n=15)</i>	0.21	0.71	0.39	0.61	0.50
<i>Australia</i>					
<i>Total (n=15)</i>	0.36	0.39	0.30	0.41	0.48
<i>A. cerana (n=5)</i>	0.20	0.26	0.24	0.31	0.40
<i>A. mellifera (n=10)</i>	0.61	0.56	0.38	0.67	0.54

Isolate	X580	X639	X696	X754	X802	Composed genotype
A7	Ac	G C C C T T C G A T A G A T A G A G C G	1	C T A G T G C A C	1	1-1-1-1-1
A8	Ac	G T A A A Y	3	Y W A R T R Y R C	5	3-2-3-5-3
A12	Ac	A A T G C	2	T A A A T A T G C	2	2-3-7-2-3
A18	Ac	A A T G C	2	T A A A T A T G C	3	2-9-8-3-3
A19	Ac	R W R R C	7	Y W A R T R Y R C	3	7-11-8-5-3
A2	Am	A A W R R C	6	Y W A R T R Y R C	5	6-6-3-5-3
A3	Am	G T A A A C	1	T A A A T A T G C	2	1-7-3-2-4
A4	Am	G T A A A C	1	Y W A R T R Y R C	4	1-11-3-4-2
A5	Am	G T W R R C	4	Y W A R T R Y R C	5	4-11-8-5-4
A6	Am	R W R R C	7	Y W A R T R Y R C	3	7-9-3-5-3
A10	Am	R W R R C	7	Y W A R T R Y R C	6	7-10-8-6-4
A11	Am	R W R R C	7	Y W A R T R Y R C	4	7-11-5-5-4
A13	Am	R W R R C	7	Y W A R T R Y R C	3	7-5-3-5-3
A14	Am	A A T G C	2	T A A A T A T G C	5	2-12-2-2-5
A22	Am	A A T G C	2	T A A A T A T G C	3	2-4-3-2-3
Sk807	Ma	G W R R C	5	Y W A R T R Y R C	5	5-11-3-5-3
Sw479	Am	G W R R C	5	Y W A R T R Y R C	5	5-11-3-5-3
Sp1103	Am	G W R R C	5	Y W A R T R Y R C	5	5-11-3-5-3
F1109	Am	G T W R R C	4	Y W A R T R Y R C	5	4-11-3-5-3
G991	Am	G W R R C	5	T A A A T A T G C	2	5-11-3-2-3
SpN	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	7	1-8-3-7-3
Sp906	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	6	1-11-3-6-3
Sp889	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-6-5-3
SLO7	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	3	1-11-3-5-3
SpTF	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-3-5-3
Sp816	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-3-5-3
Sp801	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-9-5-3
Sp2106	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-4-5-3
Sp610	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-4-5-3
Sp402	Am	G T A A C	1	Y W A R T R Y R C	5	1-11-4-5-3
gb		A T A A C	8	T A A A T A T G C	8	8-4-2-8-1

Figure 1. Genotypes obtained for the isolates of *N. ceranae* in the 5 markers analyzed; only the variable sites are shown and the complete alignment is given in Suppl. Inf. The name of the isolate is followed by its correspondent origin: *Apis cerana* (Ac), *Apis mellifera* (Am) and *Merops apiaster* (Ma). Gb: Genbank reference sequences. The first 15 were Australian isolates and the last 15 European isolates. For each marker the sequence found in the isolate A7 was considered genotype 1, and the remaining were arbitrarily numbered. Nucleotides were named following the nomenclature of IUB code, so R= G or A, Y= C or T, W= A or T, and M= A or C.

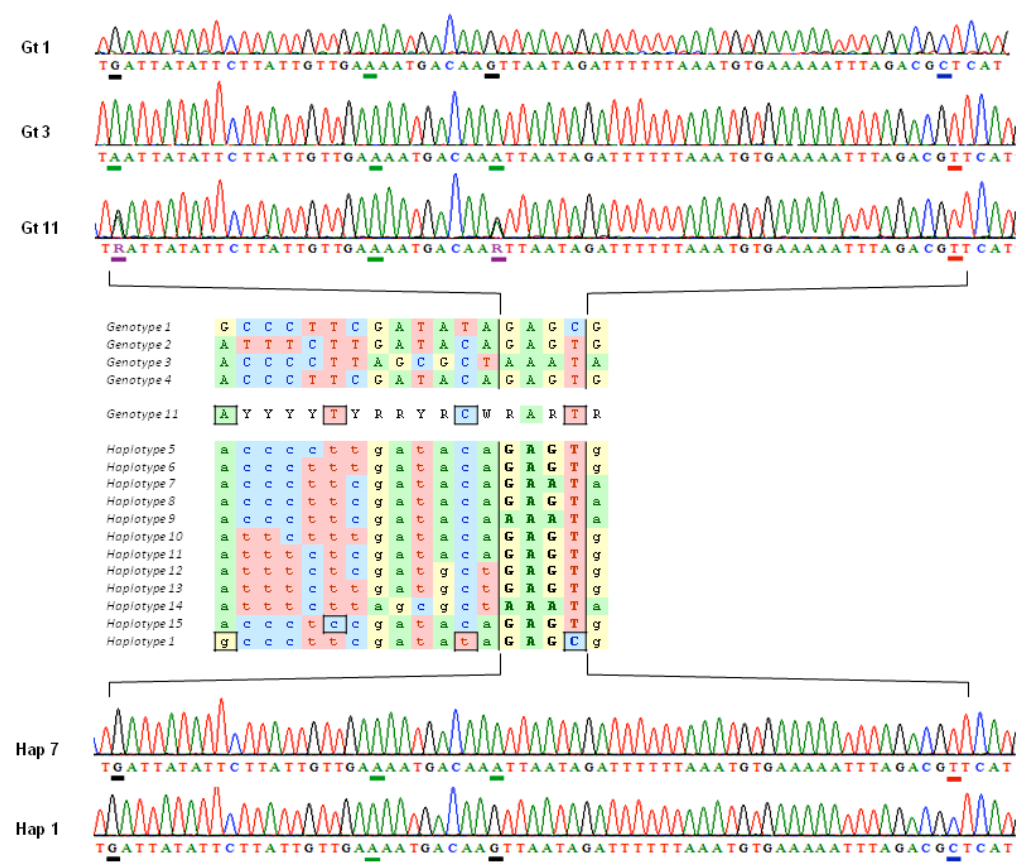


Figure 2. Partial comparison of direct sequencing results for X639 marker (above) and cloned fragments (below). Genotypes 1, 2, 3, and 4 were the only ones with no ambiguous points (see fig. 1), while the genotype 11 had 13 positions with double peaks. The chromatograms correspond to the marked segment in the haplotypes' sequences. Among the 38 clones analyzed, 15 haplotypes were obtained, including those identical to genotypes 1, 2, and 3, but also several recombinant haplotypes and even two (#1 and #15) that were not expected from the sequence of genotype 11 and must represent minority sequences existing in the original isolate (see text).

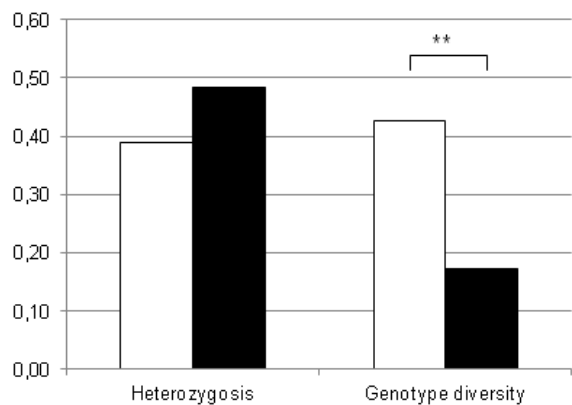


Figure 3. Mean heterozygosity per site and mean genotype diversity among European (dark bars) and Australian (white bars) isolates of *N. ceranae*. (**: $p < 0.01$)

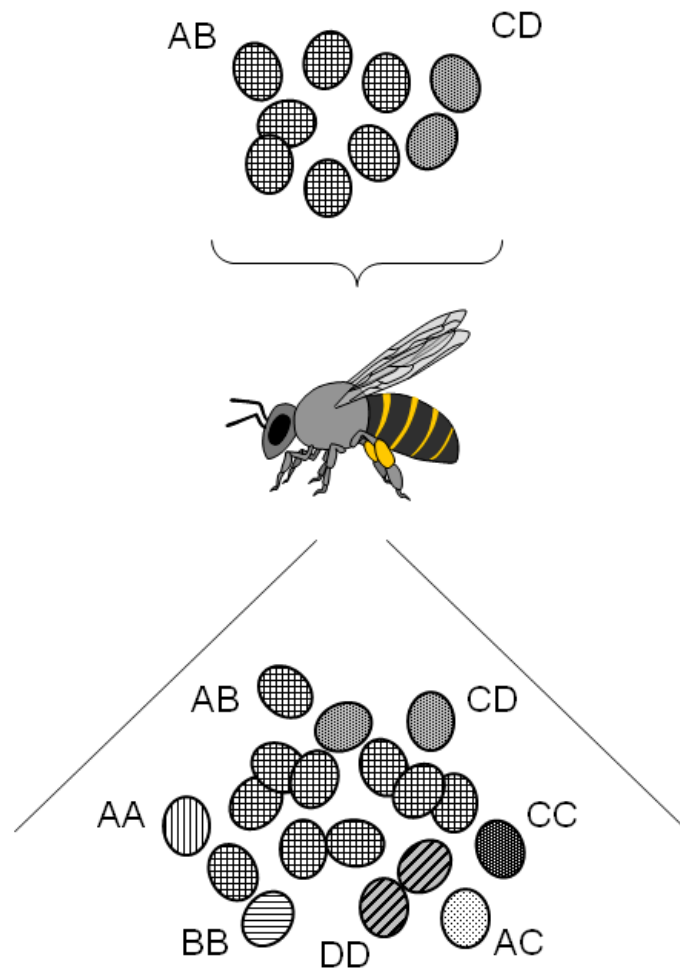


Figure 4. *Up:* A honeybee is infected by an heterogeneous collection of *N. ceranae* spores in two possible ways: diploid or pseudodiploid spores may be heterozygous for a given marker (AB), and two or more different strains may be present in the infective group of spores (AB, and CD). *Bottom:* Most new formed spores may be fully asexual and hence show the same genotypes as above; however, after an hypothetical diploid stage and meiosis, homozygous spores are also formed (AA plus BB in one case, and CC plus DD in the other); additionally if two nuclei of different origin become included in a same spore, new genotypes would also appear (AC and so on).

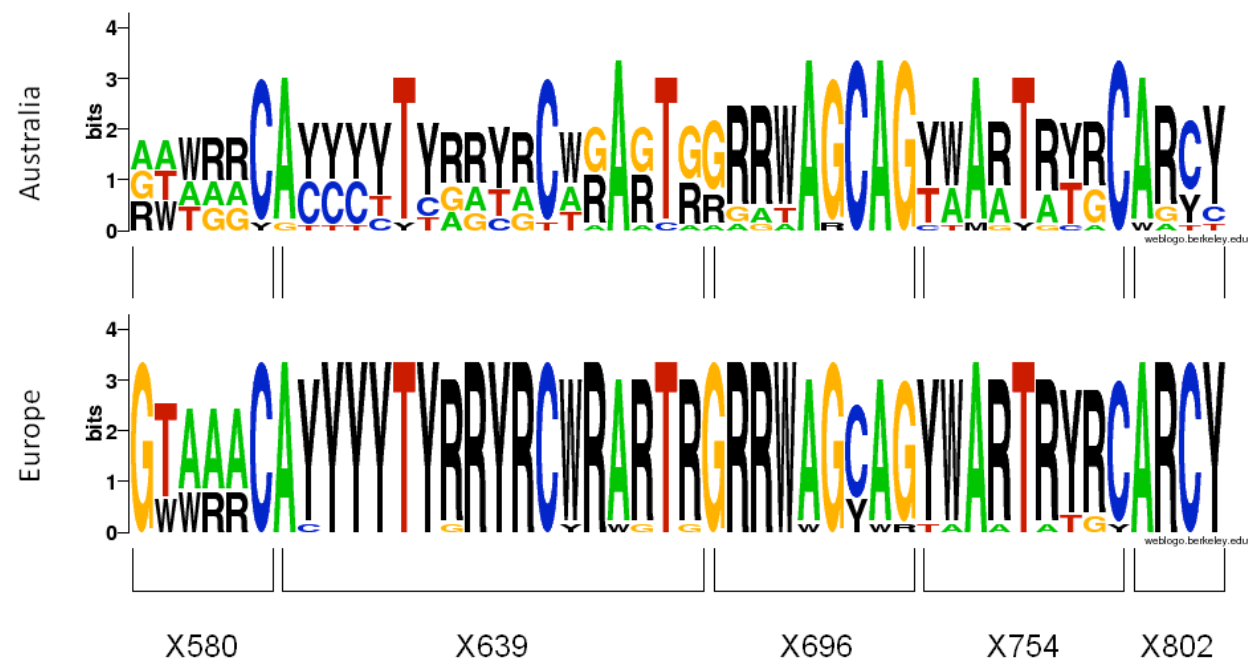


Figure 5. Sequence logo showing the genotype diversity for each polymorphic site among Australian (above) and European isolates (below).

Discusión general

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

A lo largo de los estudios realizados en la presente tesis doctoral, *N. ceranae* ha demostrado albergar una alta variabilidad tanto en sus copias de rDNA y rRNA, como en los cinco fragmentos de ADN codificante analizados, los cuales se consideran en copia única en cada genoma. A su vez, esta variabilidad no es solo fruto de un número de SNPs e Indels distribuidos por los fragmentos genéticos, sino que existen procesos de recombinación que, barajando estos puntos, crean nuevas combinaciones genéticas, tanto en los clones de muestras analizadas como entre aislados de distintos lugares geográficos. Estos resultados asientan unas bases sólidas para considerar cada aislado de esporas de *N. ceranae* como una población heterogénea de individuos, alejándose así de la antigua hipótesis de cepas clonales susceptibles de estudios filogenéticos convencionales. Del estudio realizado sobre el rDNA y rRNA, se esclarece que la variabilidad genética de la SSU no sólo existe en las distintas copias del gen, sino que la diversidad de los transcritos de ARN ribosómico se transmite y mantiene a lo largo de las distintas generaciones de esporas. Esto crea una duda razonable sobre la actividad y funcionalidad de los distintos ribosomas, al igual que genera muchas hipótesis sobre la adaptabilidad de este microsporidio a distintas condiciones climatológicas y plasticidad a la hora de parasitar otros hospedadores.

El concepto adquirido sobre el comportamiento de *N. ceranae* desde su detección en Europa hace 8 años (Higes y col., 2006) ha sido cambiante y controvertido gracias al gran desconcierto alrededor de los resultados genéticos (en muchas ocasiones, no reproducibles) de los distintos grupos de investigación dedicados a esta especie. A lo largo de estos años la controversia en torno a su genoma, genética, origen, evolución y comportamiento biológico, ha sido más que evidente gracias a una primera presunción sobre la uniformidad del grupo de los microsporidios y, en particular, del género *Nosema*. A este nivel, los microsporidios habían de compartir una serie de características como son un genoma muy reducido, una baja densidad génica, una variabilidad nucleotídica limitada a regiones no codificantes y una reproducción clonal, exceptuando ciertos casos minoritarios y aislados (Hurst, 1993; Flegel y Pasharawipas, 1995). Así, los estudios genéticos de *N. ceranae* se abordaron desde la perspectiva inicial de un microsporidio asexual, con pocos genes repetidos y uniformes, y escasas zonas no

codificantes que resultaron ser el objetivo más llamativo para diferenciar posibles cepas clonales en cada colonia de abejas.

De esta manera, el primer marcador analizado en este trabajo fue el rDNA, marcador de referencia a la hora de empezar a estudiar genéticamente una especie. Los genes ribosómicos son un claro ejemplo de genes repetidos a lo largo de un genoma, cuyas copias siempre se han supuesto si no idénticas, muy uniformes dentro de una misma especie (Nei y Rooney, 2005; Ueno y col., 2007) gracias a procesos de homogenización genética conocidos como “evolución concertada” (Dover y Coen, 1981). Pese a que ciertas especies de microsporidios rompían esta regla mostrando variabilidad entre sus copias de rDNA (Gatehouse y Malone, 1998; Tay y col., 2005; O’Mahony y col., 2007), múltiples estudios filogenéticos sobre *N. ceranae* comenzaron basándose en estos marcadores. Así pues, el estudio del rDNA completo captó inicialmente toda la atención en la presente tesis doctoral. En una primera aproximación preliminar se abarcó el análisis de dos grandes zonas de cada unidad de repetición de este marcador, la zona IGS-SSU-ITS y la zona final de la LSU, junto con su espaciador adyacente. En ambos casos quedó constancia de que las zonas no codificantes albergaban una variabilidad mayor que las secuencias de los genes, con la excepción del ITS. Este último dato resultó desconcertante, dado que este marcador está definido como un “código de barras” entre los hongos (Schoch y col., 2012) y ha sido muy utilizado en estudios de variabilidad intra e interespecífica en microsporidios (Huang y col., 2008; Santin y Fayer, 2009; Sak y col., 2011; Wilkinson y col., 2011; Li y col., 2012). La uniformidad en el ITS de *N. ceranae* hace pensar que contiene secuencias de reconocimiento para el procesamiento de los rRNA. En cuanto a los otros dos segmentos no codificantes, sus secuencias son altamente variables y albergan un gran número de indels, que en el caso de la zona adyacente a la LSU son inserciones de tamaño y secuencia muy variable. Tras estos resultados estas zonas se descartan para el diseño cebadores y sondas en PCRs de diagnóstico, con fines filogenéticos o cuantificación de cargas parasitarias. En cuanto al análisis de los genes ribosómicos, el estudio preliminar del rDNA deja claro que la LSU contiene un mayor número de dominios conservados que la SSU, lo cual lo convierte a priori en un marcador más fiable a la hora de diseñar experimentos de *q*-PCR

encaminados a determinar cargas parasitarias, aunque su bajo grado de variabilidad no parece ser muy útil a la hora de diferenciar posibles cepas en *N. ceranae*.

Consecuentemente, el fragmento que parecía mostrar un grado de variabilidad potencialmente interesante de cara a caracterizar los distintos aislados de *N. ceranae* fue el IGS-SSU. Por este motivo, este fragmento genético fue el elegido para un estudio más profundo detallado en el segundo capítulo de esta tesis. Aquí se analizaron 14 muestras de ADN de aislados de distintas colonias de abejas (procedentes de diferentes regiones geográficas), siendo 7 de ellas aislados de una sola abeja. Las 105 secuencias de clones obtenidas en total se reorganizaron en 79 haplotipos diferentes, entre los cuales resaltó, una vez más, el alto grado de variabilidad nucleotídica, tanto en forma de SNPs como Indels. Aunque la mayor cantidad de puntos polimórficos se encuentran en el espaciador, como era previsible en una región no codificante, la SSU alberga un grado de variabilidad muy notable, a la vez que inesperado, dada la naturaleza conservada que en principio se atribuye a estos genes gracias a la evolución concertada. Es en este punto donde se abre uno de los interrogantes más importantes de esta tesis doctoral, y es que teniendo en cuenta que los aislados analizados corresponden a distintos años y lugares geográficos, y que *N. ceranae* completa su ciclo biológico en tan solo tres días, ¿por qué la evolución concertada no está actuando en pos de homogenizar las distintas unidades de rDNA dentro de *N. ceranae*? En el año 2013, Ironside publicó un trabajo basado en el estudio de varias especies de los géneros *Nosema* y *Vairimorpha*, en el que relacionaba íntimamente la disposición de las copias de rDNA a lo largo de un genoma (en tándem o dispersas) con la susceptibilidad de homogenización por los procesos involucrados en la evolución concertada, tanto en microsporidios supuestamente sexuales como asexuales. Según Ironside, las copias en tándem albergan menor variabilidad ya que procesos como la conversión génica o recombinaciones desiguales entre cromátidas hermanas (SCE), lo que se conoce como evolución concertada, se encargan de homogeneizar las distintas copias de rDNA. Sin embargo, las copias dispersas albergan un mayor grado de polimorfismo que parece ser el resultado de procesos de “nacimiento y muerte de genes” y de una fuerte selección purificadora (Ironside, 2013). Según esta teoría, las copias de rDNA en *N. ceranae* deberían estar dispersas a lo largo del genoma, pero en

los resultados obtenidos en las electroforesis del primer capítulo de esta memoria, al realizar una PCR optimizada amplificando un fragmento de rDNA, se obtenían sistemáticamente 3 bandas inespecíficas de mayor tamaño, que no solo coincidían en tamaño con la repetición de un bloque, sino que las secuenciaciones de sus clones no mostraron ninguna secuencia no deseada. Esto evidencia que, aunque no se puede descartar la existencia de copias dispersas, al menos debe haber 4 disposiciones en tándem del rDNA. Sea como fuere, ni la evolución concertada en copias en tándem, ni una selección purificadora tras procesos de nacimiento y muerte de genes en copias dispersas, están actuando con intensidad suficiente como para uniformizar las múltiples copias de estos genes.

Al analizar en profundidad cada uno de los haplotipos obtenidos en este trabajo (presentado en el capítulo II de esta memoria) se observa que, sorprendentemente, no están constituidos únicamente por clones de una misma muestra, como debería ocurrir en el caso de cepas generadas a partir de una reproducción asexual. Contrariamente a esto, es frecuente que cada haplotipo pueda ser común a varios aislados, indiferentemente de si dicho aislado procede de un macerado de decenas de abejas de la misma colonia, de una única abeja individual, de colonias de abejas próximas o alejadas geográficamente. Esto desemboca en que un mismo aislado contenga secuencias pertenecientes a diferentes haplotipos, lo cual deja claro que cada aislado de ADN no contiene copias homogéneas de los genes ribosómicos. Pero, curiosamente, ciertas copias de los mismos parecen mantenerse comunes entre clones de distintos aislados. Este suceso es complicado de explicar; por un lado podría ocurrir que una mezcla de distintas poblaciones de esporas esté coexistiendo en una colonia de abejas, pero eso implicaría que todas las colonias analizadas aquí estuviesen sistemáticamente infectadas por una mezcla muy heterogénea de esporas, nunca por una o por un bajo número de ellas y que, tras el proceso infectivo, la heterogeneidad de dicha colección de esporas se mantuviese intacta. Esto no parece demasiado plausible, ya que la deriva genética que sufre cada población durante meses debería hacer diferenciabiles aislados tan alejados geográficamente como son los casos de España y Kirguistán. Y sin embargo, existen haplotipos comunes entre estos dos aislados de ADN. Así pues, estos resultados

evidencian la existencia de varias copias diferentes de rDNA intragenómicas en *N. ceranae*, al igual que ocurre en otras especies de *Nosema*.

Por otro lado, el alto número de combinaciones genéticas obtenidas no es más que el resultado de una alta variabilidad genética susceptible de procesos de recombinación, los cuales se encargan de barajar estos SNPs e indels resultando así haplotipos distintos. Los procesos de recombinación en genes ribosómicos, al igual que en otros, se entienden en casos de organismos diploides donde un proceso meiótico se encarga de recombinar tanto copias aisladas de un gen, como copias en tándem. Pero en este caso, *N. ceranae* posee dos núcleos que, supuestamente, son haploides e independientes, al igual que se supuso inicialmente una reproducción asexual. Ante estos resultados, la hipótesis más sugerente parecía ser el intercambio de material genético entre cromátidas hermanas por recombinaciones desiguales (SCE) e incluso conversión génica. Pero ambos mecanismos, por un lado, tienden a homogeneizar las copias a largo plazo y, por otro, generan un fuerte desequilibrio de ligamiento muy propio de poblaciones con una reproducción asexual. Sin embargo, en este caso no existe tal desequilibrio de ligamiento, así que o todas las poblaciones de esporas que infectan colonias de todo el mundo albergan la misma variabilidad, sin la posibilidad de que la propia deriva genética produzca poblaciones diferenciables genéticamente, o realmente existe un proceso sexual capaz de barajar y mantener la variabilidad a lo largo de las distintas poblaciones de *N. ceranae*.

Recientemente, en el año 2014, Krebs y colaboradores realizaron un estudio parecido en *N. granulosus* obteniendo resultados muy similares en cuanto a variabilidad y recombinación del rDNA. *N. granulosus* es un parásito de transmisión vertical al que se ha supuesto siempre asexual. En este trabajo, se postulaban los procesos de nacimiento y muerte de genes para dar sentido a la variabilidad genética de copias dispersas de rDNA. Esta teoría describe un modelo evolutivo para familias multigenéticas, donde los nuevos genes nacen por duplicación de los existentes, manteniéndose durante largos periodos de tiempo, mientras otros se eliminan o desactivan mediante mutaciones deletéreas (Nei y Rooney, 2005). Esto explicaría la impasividad de los procesos de

evolución concertada en las copias de rDNA variables. Pero en este estudio existían secuencias que encajaban con tal teoría, y otras que sí parecían verse afectadas por la evolución concertada. De manera que no se descarta que ambas disposiciones, en tándem y dispersas, coexistan en *N. granulosis*. Por otro lado, los autores explican la variabilidad intragenómica en el rDNA por duplicación genética o genómica (O'Donnell y Cigelnik, 1997), a través de la presencia de pseudogenes (de Sousa Queiroz y col., 2011), o por un proceso lento de homogenización por evolución concertada (Denduangboripant y Cronk, 2000) y una alta frecuencia de conversión génica intra-cromosómica (Parkin y Butlin, 2004). Pero la variabilidad inicial, con la que posteriormente juegan estos procesos en el IGS de *N. granulosis*, solo se puede explicar mediante un proceso sexual oculto (Krebs y col., 2014).

La existencia de un proceso sexual en este grupo de organismos es crucial a la hora de interpretar resultados de secuencias nucleotídicas, tanto en estudios genéticos como genómicos, así como por sus consecuencias evolutivas y epidemiológicas. Teniendo en cuenta la condición de parásitos intracelulares obligados de los microsporidios, el estudio de una especie que parasita un organismo pluricelular comienza con la extracción y aislamiento de todos los parásitos dentro de ese hospedador. Un organismo asexual produce una descendencia clónica que, durante generaciones mantiene la colección de mutaciones del individuo original. Si en algún momento del proceso infectivo se produjera una mutación *de novo*, esta colonia de parásitos se convertiría en una cepa genéticamente reconocible por sus mutaciones específicas. El estudio filogenético de colonias de este tipo de especies produce árboles muy claros con una fiabilidad de cada rama elevada y clados muy bien definidos. Por el contrario, la existencia de una fase sexual garantiza la diversidad genética de la descendencia, y el estudio de una colonia completa de organismos unicelulares se convertiría en un estudio poblacional imposible de analizar como una cepa homogénea. De manera que el no conocer la naturaleza de un organismo a la hora de analizarlo genéticamente puede provocar un mal enfoque del estudio y una mala interpretación de resultados.

Por otro lado, el hecho de que exista un polimorfismo notable y repetitivo en el gen de la SSU abrió una incógnita más allá del estudio del rDNA con fines filogenéticos. El que un mismo aislado de ADN albergue distintas copias de este gen podría suponer distintas conformaciones termodinámicas de la SSU-rRNA, en el caso de que todas las variantes encontradas en el ADN se expresaran. Por ello, se diseñó un experimento contrastando el rDNA del gen de la SSU completo junto con su rRNA para averiguar si las distintas copias eran pseudogenes, o si realmente eran variantes activas. Para ello se analizó un solo aislado de ADN de *N. ceranae*, se amplificó todo el segmento IGS-SSU completos y se clonó con el fin de obtener la secuencia completa de la SSU. Los 5 clones obtenidos, con distintos haplotipos, seguían la dinámica de resultados anteriores en cuanto a sus puntos variables. Paralelamente, el estudio del fragmento que alberga la variabilidad más representativa de la SSU mostró que todas las variantes del gen que aparecen en el genoma se transcriben a rRNAs activos, y que los puntos variables obtenidos sistemáticamente no se encuentran distribuidos aleatoriamente. La variabilidad encontrada consiste en varios SNPs, indels de un solo nucleótido (normalmente en zonas poli-A o poli-T), y el indel del tetranucleótido GATT, presente en todos los estudios realizados de la SSU. Al localizar estos puntos variables en la estructura secundaria de la SSU-rRNA, se observa que 19 de los 26 SNPs totales se encuentran debilitando la doble hélice de rRNA. Por otro lado, los 7 SNPs restantes, junto con los indels observados en este estudio, se encuentran en áreas de hebra sencilla que conforman esas “burbujas” características de las estructuras secundarias de las subunidades ribosómicas. Entre estos resultados llaman la atención dos zonas de la estructura que se ven sistemáticamente afectadas por varios SNPs e indels, el dominio h26 y el codo que une h7 y h8 (nomenclatura basada en la estructura de *E. coli*). El dominio h26 fue definido por Woese y colaboradores (1983) como una zona rica en pares G-U, que son más débiles que los correspondientes pares G-C o A-T. Todas las mutaciones observadas en esta zona favorecen esta clase de uniones, debilitando así la doble hélice de ARN, menos una (G662A) que la fortalece. Parece lógico el mantenimiento de estos SNPs se mantengan en *N. ceranae*, ya que esta hélice parece necesitar uniones que le permitan una apertura rápida de la doble hélice para el funcionamiento correcto de la subunidad pequeña del ribosoma. Por otro lado, el

dominio h8 es de vital importancia para el funcionamiento de la SSU en combinación con h14, y las mutaciones descritas en ella son fuertemente deletéreas. La unión h8-h14 tiene varias funciones importantes definidas, como son la unión del factor EF-Tu (relacionado con el proceso de descodificación) y la formación del puente B8 con la subunidad 50S. Pero h14 y h8 no se encuentran en puntos muy cercanos de la estructura secundaria y, obviamente, el rRNA ha de doblarse para unir ambos dominios. Aunque el codo que da movilidad a h8 no tiene una función descrita, el hecho de que el indel GATT se mantenga a lo largo de generaciones de esporas, y en poblaciones de todo el mundo, hace suponer que proporciona alguna ventaja sobre el funcionamiento de este dominio. Por último, dos mutaciones encontradas sí tienen una implicación negativa asociada; son G46A y A970G, descritas en *E. coli* como medianamente y moderadamente deletéreas (respectivamente), pero lejos de cualquier dominio de importancia reconocida. No obstante, ambas mutaciones aparecen únicamente en las secuencias de ADN genómico, sin encontrarse en los transcritos de ARN. Este hecho también hace pensar que *N. ceranae* no crea nuevas variantes de sus genes ribosómicos aleatoriamente, sino que las deletéreas desaparecen, y las favorables se mantienen. Este hecho apoya de nuevo la hipótesis del origen de los genes ribosómicos en procesos de nacimiento y muerte de genes, donde se crean nuevas variantes por duplicación de los existentes, manteniéndose durante largos periodos de tiempo, mientras otros se eliminan o desactivan mediante mutaciones deletéreas (Nei y Rooney, 2005).

El hecho de que *N. ceranae* pueda obtener alguna ventaja evolutiva por albergar distintos ribosomas se correlaciona con varios aspectos de su comportamiento natural. Este microsporidio, inicialmente parásito de *A. cerana*, ha saltado a su nuevo hospedador *A. mellifera* con mucha facilidad, incluyendo sus distintas subespecies distribuidas por el mundo; igualmente, se ha descrito en varias subespecies de abejas orientales, como *A. florea*, *A. dorsata*, *A. Koschevnikovi* (Botías y col., 2009, Chaimanee y col., 2010), y se ha detectado en otros géneros de himenópteros, como *Bombus* (Plischuk y col., 2009; Li y col., 2012; Graystock y col., 2014). En todos los casos, las colonias de abejas analizadas proceden de muy diferentes lugares geográficos, con diversas climatologías, diferente comportamiento biológico de cada colonia de abejas, distinta

alimentación y coexistencia con diferentes parásitos en cada caso. Todos ellos son factores que afectan directamente a las cargas parasitarias de las colonias en casos como *N. apis* (OIE, 2008). Y, sin embargo, estas barreras no parecen ser suficientes para frenar la infección de *N. ceranae*. En 1987, Gunderson y colaboradores describieron 3 tipos diferentes de ribosomas en *Plasmodium berguei*, que se expresaban en momentos diferentes de su ciclo en función del entorno. Aunque han sido varios los trabajos que aseguran que el hecho de poseer más de una secuencia ribosómica activa no afecta al desarrollo biológico del organismo, ninguno de ellos se ha realizado en condiciones naturales, sino experimentales. Por el momento no podemos afirmar si *N. ceranae* expresa una variante u otra de SSU-rRNA si no se estudia la expresión de su rRNA en diferentes condiciones de campo, alternando temperatura, hospedadores y comportamiento de las colonias. Pero estos resultados dan una explicación muy plausible a la alta plasticidad de este microsporidio en distintos entornos y abren interesantes líneas de investigación.

De esta manera, el estudio de los genes ribosómicos de *N. ceranae* abrió una hipótesis sólida sobre un posible ciclo sexual en esta especie, y la existencia de distintas poblaciones de esporas en cada uno de sus aislados de ADN, además de demostrar la existencia de distintos ribosomas que, potencialmente, podrían suponer una ventaja evolutiva a este microsporidio. Pero estos genes están repetidos por genoma y parece ser que en un número considerable. De manera que para hacer un estudio más informativo sobre recombinación asociada a procesos sexuales, descartando los procesos de recombinación por sobrecruzamientos desiguales, fue necesario el estudio de marcadores en copia única. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente 5 fragmentos de más de 1000 pb del proyecto genoma de *N. ceranae* (Cornman y col., 2009), que albergan secuencias de genes exclusivos del parásito. Aunque no hay evidencias absolutas de que esos genes sean de copia única, el hecho de que los microsporidios tengan un genoma eucariota pequeño y su número de genes esté reducido, concede más posibilidades a que varios, si no todos los fragmentos analizados, se encuentren en copia única. Así, se analizaron 30 muestras (15 australianas y 15 europeas) con el fin de estudiar la variabilidad y recombinación entre secuencias codificantes. Los resultados

muestran variabilidad a lo largo de los 5 marcadores, tanto en las muestras europeas como australianas. Esta variabilidad consiste en la coexistencia de dos nucleótidos alternativos (nunca más) en ciertos puntos de cada secuencia, la cual se observa en forma de dobles picos en los cromatogramas de secuenciación directa de los productos de PCR. Al poseer *N. ceranae* dos núcleos, supuestamente haploides, se pueden considerar los dobles picos como variantes bialélicas de un organismo pseudodiploide, donde los genotipos monoalélicos se pueden considerar homocigotos, y los que albergan dos variantes, heterocigotos. Entre los resultados, solo hubo una muestra homocigota para todos los marcadores, mientras que las otras 29 siempre mostraron heterocigosis en al menos uno. Esto hace que en cada alineamiento haya un número de representantes polimórficos alto, incluso en secuencias codificantes. Pero la naturaleza de dicha variabilidad es diferente en cada caso: 3 marcadores mostraron un mayor número de mutaciones sinónimas, lo cual apunta hacia una selección purificadora, mientras que por el contrario, los otros dos mostraron una selección direccional al albergar una mayor tasa de mutaciones no sinónimas. Este hecho comienza a asentar la hipótesis de que el mantenimiento de las mutaciones en *N. ceranae* no es resultado del azar, primero porque en ningún caso se han encontrado genotipos donde más de 2 nucleótidos coexistan en un mismo punto, y segundo porque cada marcador parece estar sometido a distintos procesos evolutivos.

Por otro lado, al estudiar la distribución de los diferentes genotipos a lo largo de los dos continentes, se observa que en Australia existe un mayor número de genotipos frente a Europa, o lo que es lo mismo, alberga mayor diversidad genotípica. Sin embargo, aunque Europa suele tener menor número de genotipos, la heterocigosis es más elevada. Cuando se realizó el estudio sobre los clones de uno de los genotipos más variables, quedó claro que un genotipado, por ejemplo, RR podía estar formado por una mezcla de esporas AA, GG, AG y GA simultáneamente. Esto implicaba un mayor grado de variabilidad en el continente europeo. No obstante, teniendo en cuenta la teoría de Botías y colaboradores (2012a) y Roudel y colaboradores (2013) sobre el probable origen asiático de *N. ceranae*, seguido de una expansión poblacional reciente, los genotipos

altamente heterocigóticos encontrados en Europa se podrían explicar también como una mezcla de los homocigotos encontrados en Australia.

Una vez más, el hecho de que exista recombinación tanto en clones de un mismo aislado, como entre aislados de distintos lugares geográficos, apoya definitivamente la idea de una reproducción sexual. En este estudio se han obtenido resultados que demuestran que *N. ceranae* ha de tener un proceso sexual oculto que aumenta, recombina y mantiene la diversidad genética de sus esporas. Éstas evolucionan dentro de un hospedador hasta crear nuevas generaciones distintas a las anteriores, que posteriormente se dispersaran a otras colonias bien de manera natural, bien por la mano del hombre a través de la industria apícola, y se mezclarán de nuevo con otras poblaciones en otros lugares. Los productos apícolas juegan un gran papel en la dispersión de esporas infectivas de *N. ceranae* a lo largo de diferentes áreas geográficas (Klee y col., 2007; Higes y col., 2008b; Mutinelli y col., 2011), al igual que el comercio de reinas (Giersch y col., 2009).

Los resultados de este último estudio terminan de asentar la hipótesis de que un aislado de esporas de una colonia no se corresponde con una cepa homogénea, sino que, en realidad, al analizar un aislado de esporas se aborda el estudio de una población. Por otro lado, el hecho de que los genotipos en los que se agrupan las 30 muestras no coincidan entre marcadores -es decir, una muestra puede formar parte del genotipo más común en uno de los marcadores, mientras que en el siguiente marcador puede ser el único representante de otro genotipo- crea distintos cuadros de dispersión de poblaciones en cada caso. Este hecho ha de tenerse muy en cuenta para, por ejemplo, un análisis filogenético, ya que las muestras se situarían en diferentes grupos en función del marcador elegido. En el año 2007, Ironside publicó un estudio filogenético con microsporidios en el que utilizaba tres marcadores moleculares diferentes para analizar las mismas muestras, y en cada caso obtuvo árboles distintos. De manera que el estudio filogenético de *N. ceranae* ha de plantearse con mucha cautela, basándose en más de un marcador molecular y previa caracterización de su variabilidad intrapoblacional.

N. ceranae es un parásito muy virulento para *A. mellifera*, con capacidad de parasitar diferentes himenópteros y con alta plasticidad para adaptarse a nuevos entornos, que durante los últimos años ha causado y sigue causando daños muy importantes en la industria apícola. Con la intención inicial de poder realizar una trazabilidad de cepas más o menos virulentas a lo largo de colonias de todo el mundo, muchos estudios genéticos abordaron el estudio de marcadores sin tener en cuenta el comportamiento natural de este microsporidio, lo cual dio lugar a resultados incongruentes y a un proyecto genoma aún por ensamblar a día de hoy. Pero las crecientes evidencias de un *N. ceranae* que rompe normas básicas de los microsporidios, como son su reproducción sexual, los genes repetidos en un número de copias notable, la variabilidad intragenómica y su comportamiento poblacional, suponen un reto a la hora de analizarlo. A este hecho se suman los resultados fallidos para su cultivo en líneas de células conocidas, que no ha ido más allá de unos pocos pases (Gisder y col., 2011), y los grandes inconvenientes de la microscopía electrónica a la hora de asegurar si sus formas intermedias mononucleadas son o no artefactos de la técnica. Los estudios genómicos, utilizados en microsporidios últimamente como una herramienta accesible y versátil, se ven ahora abordando el estudio de muestras heterogéneas formadas por varios individuos, donde el objetivo primero no es ya el mapeo de un genoma, sino el dar una explicación plausible al comportamiento, evolución y naturaleza de la variabilidad de *N. ceranae*. Estos estudios, por otro lado, se ven obligados a cambiar sus protocolos para partir de una muestra lo más pequeña posible, y tratar así de minimizar el número de individuos a analizar. Los estudios de q-PCR realizados se ven comprometidos en función de los marcadores utilizados, y los antiguos estudios filogenéticos de múltiples muestras desembocan inevitablemente en un estudio profundo e individual de aislados puntuales. Actualmente, abordar un estudio genético de *N. ceranae* obliga a cambiar protocolos, a plantear experimentos multidisciplinarios y estudiar profundamente cada técnica en busca de una optimización no descrita para este tipo de organismo.

CONCLUSIONES

1. El rDNA de *N. ceranae* es un marcador muy variable, especialmente en sus zonas no codificantes, y se desaconseja su uso en estudios filogenéticos y experimentos de cuantificación de la carga parasitaria sin previo estudio de su variabilidad intraespecífica.
2. Los procesos de recombinación, tanto en las secuencias de rDNA como en los marcadores codificantes estudiados en la presente tesis doctoral, demuestran la existencia de un proceso sexual oculto que crea, recombina y mantiene una diversidad genética en *N. ceranae*.
3. La existencia de distintas variantes activas de la SSU-rRNA abre una hipótesis sólida sobre una posible ventaja evolutiva en *N. ceranae*, que se ve reflejada en su gran plasticidad y adaptabilidad a la hora de parasitar nuevas especies, sobrevivir en distintas condiciones climatológicas y rápida dispersión a lo largo de colonias de todo el mundo.
4. El estudio de los marcadores codificantes, supuestamente en copia única, deja claro que el análisis filogenético de *N. ceranae* se debe basar en múltiples marcadores genéticos, previo estudio de su variabilidad intrapoblacional.
5. *N. ceranae* es un microsporidio que, debido a su reproducción sexual y su alto grado de variabilidad genética, forma poblaciones heterogéneas de esporas tras cada proceso infectivo, lo cual provoca que el estudio de cada aislado de esporas se haya de abordar desde un punto de vista poblacional.

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Resumen

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos: Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

En el año 2006, Higes y colaboradores describieron la presencia de un nuevo patógeno en la abeja melífera occidental, *Apis mellifera*, cuya presencia se asoció con el fenómeno de mortalidad masiva que ha sacudido la apicultura mundial en la última década. Este parásito exótico en Europa se identificó como el microsporidio *Nosema ceranae*, descrito previamente como parásito habitual de la abeja oriental, *Apis cerana*.

Desde su descubrimiento hace 150 años, los microsporidios han captado tanta atención en investigación, como controversia han creado en el mundo científico. Estos organismos están descritos como hongos parásitos unicelulares que precisan de una célula hospedadora para llevar a cabo su ciclo biológico. Entre las características citológicas propias de los microsporidios destaca su pequeño genoma, fruto de una larga historia de parasitación intracelular, que hace que estos organismos no puedan subsistir sin explotar los recursos de una célula huésped. Además de la relevancia económica y medioambiental de las microsporidiosis, el pequeño tamaño del genoma de estos organismos ha abierto muchas líneas de investigación, ya que su proceso de reducción y compactación a lo largo de su historia evolutiva supone una base muy sólida para el estudio de genomas pequeños y creación de genomas sintéticos. Por otro lado, los genomas de los microsporidios se caracterizan de manera general por una baja densidad génica y una variabilidad nucleotídica limitada a regiones no codificantes. A la hora de interpretar resultados genéticos basados en estos microorganismos se ha de tener muy en cuenta su tipo de reproducción, ya que si bien la bipartición es supuestamente el proceso reproductivo más común entre ellos, existen ciertos casos, calificados como minoritarios y aislados, que llevan a cabo meiosis.

La detección de *N. ceranae* en *A. mellifera*, como se ha indicado, coincidió con un fenómeno de desdoblamiento y colapso generalizado en colonias de abejas de todo el

mundo. Este fenómeno se detectó por primera vez en Europa y, en menos de dos años, se convirtió en un problema a nivel mundial. Este suceso ha provocado un descenso generalizado en las poblaciones de abejas, con la consecuente disminución drástica de las actividades apícolas en todo el hemisferio norte. Además, *A. mellifera* desempeña un papel de gran importancia en el proceso de polinización, con lo cual el descenso drástico y prolongado en el tiempo de las colonias de abejas melíferas ha supuesto un grave peligro al equilibrio de ecosistemas. Así pues, la valoración de los daños causados, tanto desde un punto de vista económico como medioambiental, es muy negativa. Tras años de investigación, *N. ceranae* se ha convertido en el principal sospechoso de este fenómeno, y en el agente etiológico de una nueva enfermedad de las abejas melíferas denominada nosemosis tipo C.

Desde su detección, son muchas las dudas en cuanto al comportamiento, plasticidad, origen, virulencia y evolución que rodean a este microsporidio. *N. ceranae* ha sido una especie difícil de estudiar debido, por un lado, a la falta de cultivos celulares viables para el estudio in vivo de su ciclo biológico y su acción patogénica, y por otro, la poca información preliminar disponible sobre este microsporidio debido a la poca relevancia de *A. cerana* en el mundo de la apicultura.

De esta manera, la primera elección para el diagnóstico y el estudio genético de *N. ceranae* fueron los genes ribosómicos junto con sus espaciadores. Los genes ribosómicos se han utilizado durante mucho tiempo como marcadores de diagnóstico e identificación de microorganismos basándose en la supuesta uniformidad de sus copias dentro de una misma especie, y en su naturaleza conservada gracias a procesos de homogeneización como la evolución concertada. Estos marcadores se convirtieron en el marcador de referencia tanto en estudios filogenéticos como en estudios de variabilidad intraespecífica de *N. ceranae*. La búsqueda de distintas cepas dentro de esta especie fue el objetivo de muchos investigadores ya que se precisaba información sobre el origen de la introducción de este nuevo patógeno en Europa, su diseminación por todo el mundo, e incluso sobre una posible trazabilidad de su grado de virulencia. Pero, una vez se llevaron a cabo los primeros estudios basados en el rDNA, una gran confusión se hizo

presente alrededor de los resultados genéticos (en muchas ocasiones, no reproducibles) obtenidos por los distintos grupos de investigación dedicados a esta especie.

Ante esta situación, el primer objetivo de la presente memoria fue el análisis de los genes ribosómicos de *N. ceranae*, su variabilidad y su naturaleza recombinante, con el fin de dar respuesta al porqué de la heterogeneidad de resultados anteriores basados en el rDNA, además de determinar las zonas más fiables para futuros diseños de experimentos genéticos. Igualmente, se propuso como objetivo el análisis del polimorfismo del rDNA en los transcritos de rRNA, con la finalidad de aportar una aproximación sobre sus posibles consecuencias en la actividad de los ribosomas. Por otro lado, la existencia de reproducción sexual en otras especies de microsporidios provocó la necesidad de estudiar procesos de recombinación, primero en el rDNA, y después en marcadores moleculares en copia única, con el objetivo de interpretar correctamente los resultados genéticos obtenidos. Por último, la búsqueda de marcadores genéticos en copia única se plantea como posible alternativa al rDNA en estudios de filogenias, y abre una nueva línea de investigación sobre la naturaleza poblacional de los diferentes aislados de *N. ceranae*.

A lo largo de los estudios realizados en esta tesis doctoral, *N. ceranae* ha demostrado romper las reglas iniciales propuestas para el género *Nosema* albergando una alta variabilidad genética, tanto en las copias de genes repetidos (rDNA), como en los fragmentos de ADN codificante analizados. Del estudio preliminar sobre las dos amplias zonas del rDNA (la zona IGS-SSU-ITS y la zona final de la LSU, junto con su espaciador adyacente) se esclarece que los espaciadores albergan mayor variabilidad que las secuencias génicas, menos el caso del ITS. La uniformidad en este último hace pensar que contiene secuencias de reconocimiento para el procesamiento de los rRNA. Por otro lado, el espaciador adyacente a la LSU contiene diferentes inserciones, de tamaño y secuencia variable, que lo descarta como diana a la hora de diseñar cebadores y sondas de PCR. En cuanto a las secuencias génicas, la SSU alberga mayor grado de polimorfismo que la LSU, lo cual alerta sobre la cautela en el diseño de PCRs en esta zona. La LSU-rDNA, sin embargo, posee un mayor número de zonas conservadas, pero su

grado de polimorfismo es menor, lo cual lo hace menos interesante de cara al estudio de variabilidad intraespecífica.

Los resultados del estudio del fragmento IGS-SSU muestran que la variabilidad encontrada no es solo fruto de un número de SNPs e Indels distribuidos por los fragmentos genéticos, sino que existen procesos de recombinación que, barajando estos puntos, crean nuevas combinaciones genéticas, tanto en los clones de muestras analizadas como entre aislados de distintos lugares geográficos. La recombinación se puede entender en unidades repetidas en tándem como el resultado de sobrecruzamientos desiguales y/o conversión génica, pero el alto grado de polimorfismo inicial y la ausencia de desequilibrio de ligamiento solo se pueden explicar mediante un proceso meiótico. La existencia de un proceso sexual en este grupo de organismos es crucial a la hora de interpretar resultados de secuencias nucleotídicas, tanto en estudios genéticos como genómicos, así como por sus consecuencias evolutivas y epidemiológicas. Los resultados obtenidos del rDNA proponen una nueva hipótesis acerca de la naturaleza heterogénea de cada aislado de esporas de *N. ceranae*, alejándose así de la antigua hipótesis de cepas clonales susceptibles de estudios filogenéticos convencionales.

Del estudio realizado sobre el rDNA y rRNA, se esclarece que la variabilidad genética de la SSU no sólo existe en las distintas copias del gen, sino que la diversidad de los transcritos de ARN ribosómico se transmite y mantiene a lo largo de las distintas generaciones de esporas. Esto crea una duda razonable sobre la actividad y funcionalidad de los distintos ribosomas, al igual que genera muchas hipótesis sobre la adaptabilidad de este microsporidio a distintas condiciones climatológicas y plasticidad a la hora de parasitar otros hospedadores.

De esta manera, el estudio de los genes ribosómicos de *N. ceranae* abrió una hipótesis sólida sobre un posible ciclo sexual en esta especie, y la existencia de distintas poblaciones de esporas en cada uno de sus aislados de ADN, además de demostrar la existencia de distintos ribosomas que, potencialmente, podrían suponer una ventaja

evolutiva a este microsporidio. Con el fin de contrastar la información sobre el proceso sexual y la naturaleza poblacional de cada aislado de *N. ceranae*, se realizó un estudio con marcadores moleculares en copia única. Este último estudio revela un número importante de polimorfismos, donde la variabilidad consiste en dos nucleótidos alternativos (nunca más) en ciertos puntos de cada secuencia. Al poseer *N. ceranae* dos núcleos, supuestamente haploides, puede considerarse como un organismo pseudodiploide, y la presencia de variantes alélicas distintas, como heterocigosis. La variabilidad encontrada en estos fragmentos se ve afectada, en ciertos casos por una selección purificadora, y en otros por selección direccional. Este hecho apoya la hipótesis de que el mantenimiento de las mutaciones en *N. ceranae* no es resultado del azar, primero porque en ningún caso se han encontrado genotipos donde más de 2 nucleótidos coexistan en un mismo punto, y segundo porque cada marcador parece estar sometido a distintos procesos selectivos.

Los procesos de recombinación presentes en estos fragmentos, junto con los ya nombrados en el rDNA, el alto grado de polimorfismo inicial y la ausencia de desequilibrio de ligamiento en los clones del fragmento IGS-SSU, apoyan definitivamente la idea de una reproducción sexual y una heterogeneidad poblacional en cada aislado de *N. ceranae*. En este estudio se han obtenido resultados que demuestran que *N. ceranae* ha de tener un proceso sexual oculto que aumenta, recombina y mantiene la diversidad genética de sus esporas. Éstas evolucionan dentro de un hospedador hasta crear nuevas generaciones distintas a las anteriores, que posteriormente se dispersarán a otras colonias bien de manera natural, bien por la mano del hombre a través de la industria apícola, y se mezclarán de nuevo con otras poblaciones en otros lugares. Los productos apícolas juegan un gran papel en la dispersión de esporas infectivas de *N. ceranae* a lo largo de diferentes áreas geográficas, al igual que el comercio de reinas. No existen alelos diagnósticos asociados al origen europeo o australiano, ni hay tampoco diferencias entre las dos abejas hospedadoras, *A. cerana* y *A. mellifera*, lo que indica una ausencia de barreras biológicas para la transmisión de *N. ceranae*. Los aislados australianos mostraron una diversidad más elevada que los europeos; no obstante la heterocigosis es

mayor en Europa, lo que hipotéticamente podría ser uno de los responsables de la mayor virulencia de *N. ceranae* sobre *A. mellifera*.

En definitiva, *N. ceranae* es un parásito muy virulento para *A. mellifera*, que durante los últimos años ha causado y sigue causando daños muy importantes en la industria apícola. Este microsporidio posee una alta plasticidad a la hora de saltar de hospedador y una alta capacidad de adaptación a nuevos entornos, características que han favorecido su rápida dispersión. Las crecientes evidencias de su reproducción sexual, genes repetidos en un número de copias notable, variabilidad intragenómica y su comportamiento poblacional, suponen un reto a la hora de analizarlo. Los trabajos presentados en esta tesis demuestran que el estudio de un aislado de esporas no puede ser tratado como una cepa uniforme, sino como una población heterogénea. Este concepto cambia el punto de partida de los experimentos genéticos; los estudios genómicos, utilizados en microsporidios últimamente como una herramienta accesible y versátil, se ven ahora abordando el estudio de muestras heterogéneas formadas por millones de células genéticamente distintas, donde el objetivo primero no es ya el ensamblaje o el mapeo de un genoma, sino el dar una explicación plausible al comportamiento, evolución y naturaleza de la variabilidad de *N. ceranae*. Los estudios genéticos, por otro lado, se ven obligados a cambiar sus diseños para partir de una muestra lo más pequeña posible, y tratar así de minimizar el número de individuos a analizar. Los estudios de cuantificación realizados se ven comprometidos en función de los marcadores utilizados, y los antiguos estudios filogenéticos de múltiples muestras deben inevitablemente sustituirse por estudios más profundos e individuales de aislados puntuales. Actualmente, abordar un estudio genético de *N. ceranae* obliga a la adecuación de planteamientos, a experimentos multidisciplinarios y a estudiar profundamente cada protocolo, en busca de una optimización no descrita para este tipo de organismo.

Abstract

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

Evolutionary Dynamism in Small Genomes: Molecular Genetic Analysis of the Microsporidium Nosema ceranae

In 2006 a new pathogen was detected in the Western honey bee *Apis mellifera*. It was directly associated with the phenomenon of massive colony losses of honeybees, which has been shaking the roots of beekeeping in the last decade. This exotic pathogen in Europe was identified as the microsporidium *Nosema ceranae*, previously described as a common parasite of the Eastern honeybee, *Apis cerana*.

Since their discovery 150 years ago, Microsporidia have attracted as much attention in research, as they have created controversy in the scientific world. These organisms are described as unicellular fungi parasites that require a host cell to carry out their biological cycle. Among the typical cytological characteristics of Microsporidia, their reduced genome stands out as the result of a long intracellular parasitism life, which means that these organisms cannot survive without exploiting the resources of a host cell. Besides the economic and environmental significance of microsporidiosis, the small size of the genome of these organisms has opened many lines of research. The process of genomic reduction and compaction during their evolutionary history has led to a solid foundation for the study of small genomes and the creation of synthetic genomes. On the other hand, the genomes of Microsporidia species are generally characterized by a low gene density and nucleotide variability limited to noncoding regions. The type of reproduction of these microorganisms is an important factor to keep in mind when genetic results are interpreted; although the bipartition is supposed to be the main way of reproduction for Microsporidia, there are some cases, defined as a fairly small number of species, which have showed meiosis.

The detection of *N. ceranae* in *A. mellifera*, as already noted, coincided with a widespread phenomenon of depopulation and of collapse of bee colonies worldwide.

This phenomenon was first detected in Europe, and after two years, became a worldwide problem. This event has caused a general decline in bee populations, with the consequent drastic decline in beekeeping activities throughout the northern hemisphere. Furthermore, *A. mellifera* plays a major role in the pollination process, thus, the dramatic and prolonged decrease of honeybee colonies has seriously endangered the balance of ecosystems. The assessment of the damage, both economically and environmentally, is very negative. After years of research, *N. ceranae* has become the main suspect of this phenomenon and the etiologic agent of a new disease for honey bees, called nosemosis type C.

Since its detection in Europe, there are many doubts about the behavior, plasticity, origin, evolution and virulence surrounding this microsporidium. *N. ceranae* has been a difficult organism to study during these years due, on one hand, to the lack of successful cell cultures to carry out microscopic analyses of the live parasite, thus hindering the study of its biological cycle and pathogenic action. On the other hand, *N. ceranae* had been little studied previously due to the low relevance of *A. cerana* in the world of apiculture.

Therefore, the first choice for the diagnostic and the genetic study of *N. ceranae* were the ribosomal genes, and their noncoding spacers. The ribosomal genes have been used for years as diagnostic markers and identification of microorganisms based on the supposed uniformity of copies within a species, preserved by homogenization processes such as concerted evolution. These molecular markers became the prime reference for phylogenetic studies and intraspecific variability assays. The searching for "strains" in *N. ceranae* has been the objective of many researchers since it would give relevant information about the origins of this new pathogen in Europe, its spreading worldwide, and even an approach to the biological basis of the observed different degree of virulence. However, once the first molecular studies based on rDNA were performed, great confusion arose amongst different research groups regarding the genetic results (often not reproducible) of this species.

Facing this situation, the first objective of this thesis was the analysis of ribosomal genes of *N. ceranae*, their variability and recombinant nature, in order to give an answer about the heterogeneity of previous results based on rDNA, as well as determine the most reliable genome regions for future genetic experiments designs. Equally, the analysis of the polymorphism of rDNA in its transcripts of rRNA was proposed, in order to provide an approach about the possible consequences on the activity of ribosomes. On the other hand, the existence of sexual reproduction in some species of Microsporidia resulted in the need for a recombination study, first about rDNA, then about single copy markers, in order to ensure a correct interpretation of the genetic results. Finally, the searching for single copy markers arose as a plausible alternative to the rDNA phylogenies studies, and opened a new line of research about the population nature of the different isolates of *N. ceranae*.

Throughout the studies carried out in this thesis, *N. ceranae* has shown to break the rules initially assumed for the *Nosema* genus, demonstrating a high genetic variability, both in those multicopy genes (rDNA) and in single copy coding DNA fragments analyzed. The preliminary study of the two wide areas of the rDNA (IGS-SSU-ITS zone and the final sequence of LSU, together with its adjacent spacer) shows a higher variability degree in spacers *versus* gene sequences, less in ITS. Uniformity in the latter suggests that it contains recognition sequences involved rRNA processing. On the other hand, the LSU adjacent spacer contains different inserts, of variable size and sequence, which dismisses it as a valid target for the annealing of PCR primers and probes. Concerning gene sequences, the SSU houses a higher degree of polymorphism than LSU, indicating that PCRs designs along this area should be taken with caution. The LSUrDNA, however, possesses longer conserved areas with a low polymorphism.

The study of IGS-SSU zone shows that the variability is not only the result of a number of SNPs and Indels distributed by the genetic fragment, but there are also processes of recombination that, shuffling these points, create new genetic combinations both in sample clones and in isolated samples analyzed from very different geographic locations. Recombination can be interpreted as the result of unequal

crossover processes and gene conversion between repeated tandem units. However, the initial high degree of polymorphism and the absence of linkage disequilibrium can only be explained by a meiotic process. The existence of a sexual process within this group of organisms is critical to the correct analysis the nucleotide sequences results, both in genetic and genomic studies, as well as for its evolutionary and epidemiological inferences. The results obtained from rDNA study offer a new hypothesis about the heterogeneous nature of each isolate of *N. ceranae* spores, thus moving away from the assumed idea of clonal strains susceptible to conventional phylogenetic studies.

The study of rRNA clearly points out that the genetic variability of the ribosomal small subunit (SSU) exists not only in the different copies of the gene, but that it is transmitted to the ribosomal RNA transcripts and maintained throughout the different generations of spores. This creates reasonable possibilities about the activity and functions of the different ribosomes and, at the same time, generates a number of hypotheses about the adaptability of this microsporidium and its plasticity to different climatic conditions or in order to parasitize other hosts.

Briefly, the study of ribosomal genes, together with the existence of different spore populations in every DNA isolate, opened a solid hypothesis about a sexual cycle in this species. In addition, different ribosomes could potentially be an evolutionary advantage to this microsporidium. In order to test the information about sexual reproduction and population nature of *N. ceranae*, single copy protein-coding sequences were analyzed. All markers proved to be polymorphic for two alternative nucleotides (never more) in a number of specific points at each sequence. Keeping in mind that the two nuclei of *N. ceranae* are supposedly haploid, it can be considered a pseudo-diploid organism. Curiously, the variability found in these fragments is affected in some cases by a purifying selection, and in others, by directional selection. This fact supports the hypothesis that maintenance of genetic variability in *N. ceranae* is not the result of random mutations, but rather has an adaptive significance. There are no diagnostic alleles associated with Australian or European origins, as well as there are no differences between the two hosts, *A. cerana* and *A. mellifera*, thus supporting the absence of

biological barriers for *N. ceranae* transmission. The diversity from Australian isolates is significantly higher compared to European ones; however heterozygosity is higher in Europe, which could hypothetically be a factor in increasing the observed virulence of *N. ceranae* to *A. mellifera*.

The recombination processes in these fragments, together with those already obtained from rDNA, the high degree of initial polymorphism and the absence of linkage disequilibrium in the IGS-SSU cloned fragments, definitely support the idea of a sexual cycle and population heterogeneity in each isolate of *N. ceranae*. The results obtained from the last work presented in this thesis, demonstrate that *N. ceranae* must house a hidden sexual process that increases, recombines and maintains the genetic diversity of its spores. These spores evolve within a host to produce new cell lines, different from previous generations, which later will be dispersed to other colonies, by natural way or by humans through the beekeeping industry, where they will mix again with other populations in other places. At this point, bee products play an important role in the spreading of infective spores of *N. ceranae* across different geographical areas, as well as the trade of Queens.

To conclude, *N. ceranae* is a highly virulent parasite to *A. mellifera*, which in recent years has caused, and continues to cause, significant damage to the beekeeping industry. This microsporidium possesses a high plasticity when jumping to new hosts and a high capacity to adapt to new environments, characteristics that help its fast spread. The increasing evidences of its sexual reproduction, repeated genes, intragenomic variability and population behavior pose a challenge when undertaking its analysis. This thesis demonstrates that an isolate of spores cannot be treated as a uniform strain, but as heterogeneous population. This concept changes the starting point for genetic experiments. Recent genomic studies are now facing the study of heterogeneous samples housing millions of genetically different cells, where the goal is no longer the first assemblage or mapping of the genome, but to give a plausible explanation for the behavior, evolution, and nature of the polymorphisms of *N. ceranae*. On the other hand, genetic studies are now forced to start from samples as small as possible. Quantitative

PCR studies already performed are now compromised depending on the markers used, and the previous phylogenetic studies based on multiple samples should necessarily be replaced by profound and individual studies of specific isolates. Currently, undertaking a genetic study of *N. ceranae* involves adapting of approaches, carrying out multidisciplinary experiments and studying in depth each technique, searching an optimization for this type of organism.

Bibliografía

Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos:

Análisis Genético Molecular del Microsporidio *Nosema ceranae*

- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., et al. (8 co-autores), 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304:441–445.
- Ackerman, S., Kermay, A.R., Hickey, D.A., 2010. Finite populations, finite resources, and the evolutionary maintenance of genetic recombination. *Journal of Heredity* 101:S135–S141.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., et al. (16 co-autores), 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399–451.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., et al. (13 co-autores), 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59 (5):429-93.
- del Águila, C., Izquierdo, F., Granja, A.G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M., Revilla, Y., 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *International Journal for Parasitology* 36: 869–876.
- Akiyoshi, D.E., Morrison, H.G., Lei, S., Feng, X., Zhang, Q., Corradi, N., Mayanja, H., Tumwine, J.K., Keeling, P.J., Weiss, L.M., Tzipori, S., 2009. Genomic survey of the non-cultivate opportunist human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathogens* 5: e1000261. doi:10.1371/journal.ppat.1000261.
- Alaux, C., Crauser, D., Pioz, M., Saulnier C., Le Conte, Y., 2014. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *The Journal of Experimental Biology* 217, 3416-3424.

- Allen, M.F., Ball, B.V., 1996. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee World* 77, 141–162.
- Anderson, D.L., Giacon, H., 1992. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera, Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *Journal of Economic Entomology*, 85: 47-51.
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari : *Varroidae*) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165–189.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009. Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11: 2284–2290.
- Antúnez, K., Anido, M., Garrido-Bailón, E., Botías, C., Zunino, P., Martínez-Salvador, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Research in Veterinary Science* 93(3): 1441-1445.
- Archetti, M., 2010. Complementation, genetic conflict, and the evolution of sex and recombination. *Journal of Heredity* 101:S21–S33.
- Archibald, J.M., Lane, C.E., 2009. Going, Going, Not Quite Gone: Nucleomorphs as a Case Study in Nuclear Genome Reduction. *Journal of Heredity* 100(5):582–590.
- Ares, A.M., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Martín-Hernández, R., Higes, M., Bernal, J., 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 899: 146-153.

- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, B., 2014. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. PLoS ONE 9(3): e91686. doi:10.1371.
- Ayala, F.J., 1998. Is sex better? Parasites say “no”. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 3346-3348.
- Bailey, L., 1981. Honey bee pathology. Academic press, London, UK; 124 pp.
- Balbani, G., 1882. Sur les microsporidies ou sporogonies des articles. Comptes rendus de l'Académie des sciences Paris, 95: 1168-1171.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., Undeen, A.H., 1994. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal-RNA sequence data. Journal of Invertebrate Pathology 64(2): 100-106.
- Becnel, J.J., 1992. Horizontal transmission and subsequent development of *Ambliospora californica* (Microsporidia: Amblyosporidae) in the intermediate and definitive hosts. Diseases of Aquatic Organisms 13: 17-28.
- Becnel, J.J., 1994. Life cycles and host-parasite relationships of Microsporidia in culicine mosquitoes. Folia Parasitology 41: 91-96.
- Becnel, J., Andreadis, T., 1999. Microsporidia in insects. In The Microsporidia and Microsporidiosis. Wittner, M., and Weiss, L.M. (eds). Washington, DC, USA: ASM, pp. 447–501.
- Becnel, J.J., Hazard, E.I., Fukuda, T., Sprague, V., 1987. Life cycle of *Culicospira magna* (Kudo, 1920) (Microsporidia: Culicosporidae) in *Culex restuans* Theobald with special reference to sexuality. Journal of Protozoology 34: 313-322.

- Bennetzen, J.L., 2002. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetics* 115:29–36.
- Biderre, C., Pagès, M., Méténier, G., David, D., Bata, J., Prensier, G., Vivares, C.P., 1994. On small genomes in eukaryotic organisms: molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrate. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III* 317: 399-404.
- Biderre C., Pages M., Metenier, G., Canning, E.U., Vivares, C.P., 1995. Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 74: 229-231.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Higes, M., Anderson, D.L., 2009. *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species. *Proc. 41º Congreso Apimondia Montpellier* p. 161.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De la Rúa, P., Meana, A., Higes, M., 2012a. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* 93:150-155.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Días, J., García-Palencia, P., Matabuena, M., Juarranz, A., Barrios, L., Meana, A., Nanetti, A., Higes, M., 2012b. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental microbiology* 14(4):845-859.
- Botías, C., Anderson, D.L., Meana, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012c. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 108-113.

- Botías, C., 2013. Patrón epidemiológico y nuevos métodos de control para las nosemosis de *Apis mellifera* L. en España. Tesis doctoral de Cristina Botías Talamante, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 44:25.
- Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G., 2009. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 53-58.
- Brooks, W.M., 1985. In Memoriam of Edwin I. Hazard (1935-1985). *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 217-8.
- Brugère, J.F., Cornillot, E., Méténier, G., Bensimon, A., Vivarès, C.P., 2000. *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic Acids Research* 28:2026-2033.
- Burns, C., Stajich, J.E., Rechtsteiner, A., Casselton, L., Hanlon, S.E., Wilke, S.K., Savytskyy, O.P., Gathman, A.C., Lilly, W.W., Lieb, J.D., Zolan, M.E., Pukkila, P.J., 2010. Analysis of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* reveals conservation of the core meiotic expression program over half a billion years of evolution. *PLoS Genetics* 6(9):e1001135.
- Burri, L., Williams, B.A.P., Bursac, D., Lithgow, T., Keeling, P.J., 2006. Microsporidian mitochondria retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 15916-15920.

- Canning, E.U., 1998. Evolutionary relationships of microsporidio, in: Cooms G.H., Vickerman K., Seigh M., Warren A. (Eds.), *Evolutionary Relationships Among Protozoa*, Chapman and Hall, 1998, pp. 77-90.
- Canning, E.U., Curry, A., Cheney, S., Lafranchi-Tristem, N.J., Haque, M.A., 1999. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitology* 119: 273-286.
- Canning, E.U., Refardt, D., Vossbrinck, C.R., Okamura, B., Curry, A., 2002. New diplokaryotic microsporidia (phylum Microsporidia) from fresh-water bryozoans (*Bryozoa*, *Phylactolaemata*). *European Journal of Protistology* 38:247-265.
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Toni Gabaldón, T., 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology* 10:47.
- Cavalier-Smith, T., 1983. A six-kingdom classification and a unified phylogeny. Pp. 1027–1034 in H. E. A. SCHENK and W. S. SCHWEMMLER, eds. *Endocytobiology II*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Cavalier-Smith, T., 1985. *The evolution of genome size*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kindom.
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., González-Porto, A.V., de Graaf, D.C., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2014. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Research Notes* 7:649
- Chaimanee, V., Warrit, N., Chantawannakul, P., 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology* 105:207-210.

- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of the adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* 58(8):1090-1095.
- Chen, Y., Siede, R., 2007. Honey bee viruses. *Advances in Virus Research* 70, 33–80.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Ridan, D., Pettis, J.S., 2009a. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal Eukaryotic Microbiology* 56:142-147.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S., 2009b. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in Honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 204-209.
- Chen, Y.P., Huang, Z.Y., 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* 41:364–374.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Zheng, H., Melathopoulos, A.P., Zhao, Y., Liu, X., Zhang, X., Tallon, L.J., Hamilton, M.C., Sadzewicz, L.D., *et al.*, 2013. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics*, 14:451
- Choi, Y., Lee, Y., Cho, K.S., Lee, S., Russell, J., Choi, J., Jeong, G., 2011. Chimerical nature of the ribosomal RNA gene of a *Nosema* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107: 86-89.
- COLOSS workshop Conclusions. En: Proceedings Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803). Guadalajara, 2009. <http://www.coloss.org/news/nosema.workshop-proceedings-online>.

- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., Evans, J.D., 2009. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. *PLoS Pathogens* 5(6): 1–14.
- Corradi, N., Akiyosi, D.E., Morrison, H.G., Feng, X., Weiss, L.M., Tzipori, S., Keeling, P.J., 2007. Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonosporea locustae* and *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS ONE* 2(12): e1277.
- Corradi, N., Gangaeva, A., Keeling, P.J., 2008. Comparative profiling of overlapping transcription in the compacted genomes of microsporidia *Antonosporea locustae* and *Encephalitozoon cuniculi*. *Genomics* 91: 388-393.
- Corradi, N., Haag, K.L., Pombert, J.F., Ebert, D., Keeling, P.J., 2009. Draft genome sequence of the Daphnia pathogen *Octosporea bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. *Genome Biology* 10:106.
- Corradi N., Pombert, J.F., Farinelli, L., Didier, E.S., Keeling, P.J., 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications* 1:77.
- Cuomo, C.A., Desjardins, C.A., Bakowski, M.A., Goldberg, J., Ma, A.T., Becnel, J.J., Didier, E.S., Fan, L., Heiman, D.I., Levin, J.Z., Young, S., Zeng, Q., Troemel, E.R., 2012. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Research* 22: 2478-2488.
- Curgy, J.J., Vavra, J., Vivares, C.P., 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biology of the Cell* 38: 49-52.

- de Graaf, D.C., Raes, H., Jacobs, F.J., 1994. Spore dimorphism in *Nosema apis* (Microsporidia, Nosematidae) developmental cycle. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 92-94.
- de Sousa Queiroz, C., Batista, F.R., de Oliveira, L.O., 2011. Evolution of the 5.8S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae) within a phylogeographic context. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59, 293-302.
- Delaplane, K.S., Mayer, D.F., 2000. *Crop Pollination by Bees*. CAB International, Oxon.
- Denduangboripant, J., Cronk, Q.C., 2000. High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267, 1407-1415.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouzé, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynié, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., et al. (14 co-autores), 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:11647–11652.
- Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pöhlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavier, A., et al. (2 co-autores), 2004. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science* 304:304–307.
- Donaldson, M.E., Saville, B.J., 2008. Bioinformatic identification of *Ustilago maydis* meiosis genes. *Fungal Genetics and Biology* 45:S47–S53.
- Dong, S., Shen, Z.Y., Xu, L., Zhu, F., 2010. Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of five microsporidia. *Current Microbiology* 60: 30-37.

Dover, G., Coen, E., 1981. Spring-Cleaning Ribosomal DNA - a Model for Multigene Evolution. *Nature* 290: 731–732.

Dunn, A.M., Terry, R.S., Taneyhill, D.E., 1998. Within-host transmission strategies of transovarial, feminizing parasites of *Gammarus duebeni*. *Parasitology* 117: 21–30.

Dunn, A.M., Terry, R.S., Smith, J.E., 2000. Transovarial transmission in the microsporidia. *Advances in Parasitology* 48: 56,100.

Dunn, A.M., Smith, J.E., 2001. Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection*, 3: 381-388.

Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. *Nosema* spp. Infection alters pheromone production in honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 36:522-525.

Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., López, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., et al. (3 co-autores), 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7(5): e37017.

Dyer, P.S., 2008. Evolutionary biology: microsporidia sex--a missing link to fungi. *Current Biology* 11;18:R1012-2014.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15: 645-656.

- Evison, S.E., Roberts, K.E., Laurenson, L., Pietravalle, S., Hui, J., Biesmeijer, J.C., Smith, J.E., Budge, G., Hughes, W.O., 2012. Pervasiveness of parasites in pollinators. PLoS ONE 7(1): e30641. doi:10.1371.
- Ebert, D., Herre, E.A., 1996. The evolution of parasitic diseases. Parasitology Today 12: 96-101.
- Ehrenberg, M., Elf, J., Aurell, E., Sandberg, R., Tegnér, J., 2006. Systems biology is taking off. Genome Research 13:2377-2380
- Fantham, H.B., Porter, A., 1914. The morphology, biology, and economic importance of *Nosema bombi* n. sp., parasitic in various bumble bees (*Bombus* spp.). Annals of Tropical Medicine and Parasitology 8: 622-38.
- Fast, N.M., Law, I.S., Williams, B.A., Keeling, P.J., 2003. Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution. Eukaryotic Cell 2:1069-1075.
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., del Águila, C., 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Applied and Environmental Microbiology, 75: 6886-6889.
- Feschotte, C., 2004. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. Molecular Biology and Evolution 21: 1769–1780.
- Flegel, T.W., Pasharawipas, T., 1995. A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians. Canadian Journal of Microbiology 41: 1-11.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., El Alaoui, H., Brunet, J.L., Delbac, F., Biron, D.G., 2013. Comparative susceptibility of the three

- Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. Infection, Genetics and Evolution 17:188-94.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. PLoS ONE 8(3): e57540. doi:10.1371/journal.pone.0057540
- Franzen C., 2008. Microsporidia: A review of 150 years of research. The Open Parasitology Journal, 2: 1-34.
- Fries, I., 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema Apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. Apidologie 19(3): 319-328.
- Fries, I.M., Feng, F., Silva, A.J., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. Microsporidia, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology 32:356–365.
- Fries, I., Paxton, R.J., Tengö, J., Slemenda, S.B., da Silva, A.J., Pieniazek, N.J., 1999. Morphological and molecular characterization of *Antonospora scoticae* n. gen., n. sp. (Protozoa, Microsporidia) a parasite of the communal bee, *Andrena scotica* Perkins, 1916 (Hymenoptera, Andrenidae). European Journal of Protistology 35:183-193.
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M., 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. Journal of Apicultural Research 45: 230-233.
- Furgala, B., Mussen, E.C., 1990. Protozoa. En: Morse RA, Nowogrodzki R (Ed.) Honey bee pests, predators, and diseases. Segunda edición. Comstock, Ithaca, NY. 990; pp. 49-63.

- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., et al. (33 co-autores), 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419:498–511.
- Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L., Botías, C., Martínez-Salvador, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental Parasitology* 132(4): 530-6. doi: 10.1016/j.exppara.
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L., Martín-Hernández, R., 2013. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology* 6(6):731-9. doi: 10.1111/1751-7915.12070.
- Gatehouse, H.S., Malone, L.A., 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:97-105.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40: 117-123.
- Gill, E.E., Becnel, J.J., Fast, N.M., 2008. ESTs from the microsporidian *Edhazardia aedis*. *BMC Genomics* 9: 296.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* 13(2): 404-13.

- Gladstone, M.N., Obeso, D., Chuong, H., Dawson, D.S., 2009. The synaptonemal complex protein Zip1 promotes bi-orientation of centromeres at meiosis I. *PLoS Genetics* 5(12): e1000771.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE* 8(3): e58165. doi:10.1371
- Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirtm, R.P., Lillm, R., Embleym, T.M., 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-aulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452: 624-628.
- Goldman, A.S.H., Lichten, M., 1996. The efficiency of meiotic recombination between dispersed sequences in *Saccharomyces cerevisiae* depends upon their chromosomal location. *Genetics* 144: 43–55.
- Gómez-Moracho, T., Maside, X., Martín-Hernández, R., Higes, M., Bartolomé, C., 2013. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology*, 1-7. doi:10.1017/S0031182013001790.
- Gregory, T.R., 2005. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany* 95:133–146.
- Graystock, P., Goulson, D., Hughes, W.O.H., 2014. The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ* 2:e522; DOI 10.7717/peerj.522
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P. & McCutchan, T. F., 1987. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, 238:933–937.

- Halary, S., Malik, S-B., Lildhar L., Slamovits, C.H., Hijri, M., Corradi, N., 2011. Conserved Meiotic Machinery in *Glomus spp.*, a Putatively Ancient Asexual Fungal Lineage. *Genome Biology and Evolution* 3:950–958.
- Hatjina, F., Tsoktouridis, G., Bouga, M., Charistos, L., Evangelou, V., Avtzis, D., Meeus, I., Brunain, M., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2011. Polar tube protein diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108:131-134.
- Hazard, E.I., Brookbank, J.W., 1984. Karyogamy ad meiosis in *Amblyospora* sp. (Microspora) in the mosquito *Culex salinarus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, 3-11.
- Hazard, E.I., Fukuda, T., Becnel, J.J., 1985. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora. *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 63-69.
- Heinz, E., Williams, T.A., Nakjang, S., Noël, C.J., Swan, D.C., Goldberg, A.V., Harris, S.R., Weinmaier, T., Markert, S., Becher, D., Bernhardt, J., et al., 2012. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLoS Pathogens* 8:e1002979.
- Heitman, J., 2010. Evolution of eukaryotic microbial pathogens via covert sexual reproduction. *Cell Host Microbe*. 8:86–99.
- Higes, M., Martín, R., Sanz, A., Álvarez, N., Sanz, A., García-Palencia, P., Meana, A., 2005. El síndrome del despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola*, 133: 15-21.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93-95.

- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 211-217
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., Nozal, M., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10: 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A., 2008b. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1): 76-78.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P., Meana, A., 2009a. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1: 495–498.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009b. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* 1:110–113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bernal, J., 2009c. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2(2): 243-250.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41: 375-392.

- Higes, M., Juarranz, A., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., 2013a. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 5(4), 530–536.
- Higes, M., Meana, A., Bartolome, C., Botias, C., Martín-Hernández, R., 2013b. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* 5: 17–29.
- Hinkle, G., Morrison, H.G., Sogin, M.L., 1997. Genes coding for reverse transcriptase, DNA-directed RNA polymerase, and chitin synthase from the microsporidian *Spraguea lophii*. *Biol. Bull.* 193:250-251.
- Hollande, A., 1972. Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. *Annals of Biology* 11:427-466.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M., 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honeybee workers (*Apis mellifera*). *Genomics* 14:799
- Hornitzky, M., 1985. Does *Nosema ceranae* infect bees and contaminate honey in Australia?. Publication No 08/133 RIRDC Project No PRJ-000885. Rural Industries Research and Development Corporation, NSW Departament of Primary Industries, Australian Government. 2008. <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/08-133.pdf>.
- Huang, W.F., Tsai, S.J., Lo, C.F., Soichi, Y., Wang, C.H., 2004. The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 473–481.

Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38: 30-37.

Huang, W.F., Bocquet, M., Lee, K.C., Sung, I.H., Jiang, J.H., et al., 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 9–13.

Huang, W.F., Solter, L.F., Yau, P.M., Imai, B.S., 2013. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens* 9(3):e1003185.doi:10.1371

Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O., 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417(6884): 27-8.

Hunt, R.D., King, N.W., Foster, H.L., 1972. Encephalitozoonosis: evidence for vertical transmission. *The Journal of Infectious Diseases* 126: 210-214.

Hurst, L.D., 1993. Drunken walk of the diploid. *Nature* 365: 206-207.

Innes, J.R.M., Zeman, W., Frenkel, J.K., Borner, G., 1962. Occult endemic encephalitozoonosis of the central nervous system in mice (Swiss Bagg-O'Grady strain). *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 21: 519-533.

Ishihara, R., Hayashi, Y., 1968. Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 377-85.

Ironside, J.E., 2007. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evolutionary Biology* 7:48

Ironside, J.E., 2013. Diversity and recombination of disperse ribosomal DNA and protein coding genes in microsporidia. *PLoS ONE* 8(2):e55878.

- James, T.Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., Stajichet, J.E., 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite *Cryptomycota* and microsporidia. *Current Biology* 23:1548–1553.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., et al. (5 co-autores). 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414:450-453.
- Keeling, P.J., 2004. Reduction and compaction in the genome of the apicomplexan parasite, *Cryptosporidium parvum*. *Developmental Cell* 6:614-616.
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116.
- Keeling, P.J., Slamovits, C.H., 2004. Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryotic Cell*. 3:1363–1369.
- Keeling, P.J., Slamovits, C.H., 2005. Causes and effects of nuclear genome reduction. *Current Opinion in Genetics and Development* 15:601–608.
- Keeling, P.J., Corradi, N., Morrison, H.G., Haag, K.L., Ebert, D., Weiss, L.M., Akiyoshi, D.E., Tzipori, S., 2010. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biology and Evolution* 2:304-309.
- Keeling, P., 2009. Five questions about Microsporidia. *PLoS Pathogens* 5(9): e1000489. Doi:10.1371/journal.ppat.1000489.
- Kellner, N., 1981. Studie van de levenscyclus van *Nosema apis* Zander in de Honingbij (*Apis mellifera* L.). Tesis Facultad de Ciencias, State University, Gante (Bélgica) 206 pp.

- Khoury, D.S., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2011. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. PLoS ONE 6(4):e18491.
- Khoury, D.S., Barron, A.B., Myerscough, M.R., 2013. Modelling food and population dynamics in honey bee colonies. PLoS ONE 8(5): e59084. doi:10.1371
- Klasson, L., Andersson, S.G., 2010. Research on small genomes: implications for synthetic biology. Bioessays. 32(4):288-95.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., et al. (3 co-autores), 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology 96(1): 1-10.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., 2006. Conceptos de genética. Pearson Prentice Hall, 8ª Edición. ISBN 10:84-205-5014-0, ISBN 13: 978-84-205-5014-5.
- Krajl, J., Fuchs, S., 2010. *Nosema* sp. Influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. Apidologie 41:21-28.
- Krebes L., Zeidler L., Frankowski J., Bastrop R., 2014. Patterns of genetic diversity in parasite rDNA and host mitochondrial DNA suggests (cryptic) sex in the putative apomictic microsporidian *Nosema granulosus*. Infection, Genetics and Evolution, in press.
- Ku, C.T., Wang, C.Y., Tsai, Y.C., Tzeng, C.C., Wang, C.H., 2007. Phylogenetic analysis of two putatively *Nosema* isolates from cruciferous lepidopteran pests in Taiwan. Journal of Invertebrate Pathology, 95: 71-76.

- Kyei-Poku, G., Gauthier, D., van Frankenhuyzen, K., 2008. Molecular data and phylogeny of *Nosema* infecting Lepidopteran forest defoliators in the genera *Choristoneura* and *Malacosoma*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55, 51–58.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., et al. (243 co-autores), 2001. (International Human Genome Sequencing Consortium). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860–921.
- Lederberg, J., McGray, A.T., 2001. ‘Ome sweet’Omics- A genealogical treasury of words. *The Scientists* 15 (7).
- Lee, S.C., Corradi, N., Byrnes III, E.J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology* 18:1675–1679.
- Lee, S.C., Weiss, L.M., Heitman, J., 2009. Generation of genetic diversity in microsporidia via sexual reproduction and horizontal gene transfer. *Communicative and Integrative Biology* 2:1–5.
- Lee, S.C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2010. Evolution of the sex-Related Locus and Genomic Features Shared in Microsporidia and Fungi. *PLoS ONE* 5(5): e10539. Doi: 10.1371/journal.pone.0010539.
- Li, J.L., Chen, W, Wu, J., Peng, W.J., An, J., Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R., 2012. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus spp.*) from China. *International Journal for Parasitology* 42: 49–61.
- Liyama, K., Chieda, Y., Yasunaga-Aoki, C., Hayasaka, S., Shimizu, S., 2004. Analysis of the ribosomal DNA region in *Nosema bombycis* NIS 001. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: 598–604.

- Liu, T.P., 1984. Ultrastructure of the midgut of the worker honeybee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44: 282-291.
- Liu, H.D., Pan, G.Q., Song, S.H., Xu, J.S., Li, T., Deng, Y., Zhou, Z., 2008. Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99:235-238.
- Liu, L., Li, Y., Zhang, J., Zou, W., Zhou, Z., Liu, J., Li, X., Wang, L., Chen, J., 2011. Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002. *Journal of Bacteriology* 193(22): 6389–6390.
- Liu, H., Pan, G., Luo, B., Li, T., Yang, Q., Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Zhou, Z., 2013. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. *Journal of Invertebrate Pathology* 113(1):63-69.
- Logsdon, J.M., Dorey, M., Ford Doolittle, W., 1997. Molecular evolution of recA-homologous genes in protists, p. 135. Program Abstr. 10th Int. Congr. Protozool. 1997. Business Meetings and Incentives, Sydney, Australia.
- Lom, J., Nilsen, F., Dykova, I., 2001. *Thelohania contejeani* Henneguy, 1892: dimorphic life cycle and taxonomic affinities, as indicated by ultrastructural and molecular study. *Parasitology Research* 87(10):860-872.
- Loube`s, C., Maurand, J., Rousset-Galangau, V., 1976. Pre`sence de complexes synaptone`matiques dans le cycle biologique de *Gurleya chironomi* Loube`s et Maurand, 1975: un argument en faveur d`une sexualite´ chez les Microsporidies? *Comptes Rendus de l`Acad`emie des Sciences Paris* 282,1025–1027.

- Loubés C., 1979. Recherches sur la méiose chez les Microsporidies: conséquences sur les cycles biologiques. *Journal of Protozoology* 26(2):200–208.
- Lynch, M., 2006. The origins of eukaryotic gene structure. *Molecular Biology and Evolution* 23:450–468.
- Lynch, M., Conery, J.S., 2003. The origins of genome complexity. *Science* 302:1401-1404.
- Malik, S-B., Pightling, A.W., Stefaniak, L.M., Schurko, A.M., Logsdon, J.M. Jr, 2008. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE*. 3:e2879.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L., Higes, M., 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2554–2557.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., Higes, M., 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* 109(3): 605-612.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology* 14: 2127-38. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.

- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 100:185-188.
- Medici, S.K., Sarlo, E.G., Porrini, M.P., Braunstein, M., Eguaras, M.J., 2012. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol Research* 110: 859–864.
- Merino, S.T., Gummings, W.J., Acharya, S.N., Zolan, M.F., 2000. Replication-dependent early meiotic requirement for Spo11 and Rad50. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:10477-10482.
- Méténier, G., Vivarès, C., 2001. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes and Infection* 3: 407–415.
- Michalczyk, M., Sokół, R., Szczerba-Turek, A., 2013. Phylogenetic analysis of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* small subunit 16S rRNA in honey bees (*Apis mellifera*) from north-easter Poland. *Medycyna weterynaryjna* 69(12): 733-735.
- Mittleider, D., Green, L.C., Maan, V.H., Michael, S.F., Didier, E.S., Brindley, P.J., 2002. Sequence survey of the genome of the opportunistic microsporidian pathogen, *Vittaforma corneae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49:393-401.
- Moeller, F.E., 1978. *Nosema* disease. Its control in honeybee colonies. Department of Agriculture. Washington, D.C. N.S. Bulletin Nº1569. 1978; 16 pp.
- Moodie, E.G., Le Jambre, L.F., Katz, M.E., 2003. *Thelohania montirivulorum* sp nov (Microspora : Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda : Parastacidae): fine ultrastructure, molecular characteristics and phylogenetic relationships. *Parasitology Research* 91(3):215-228.

- Moran, N.A., 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108:583–586.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., et al. (17 co-authors), 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317:1921–1926.
- Morse, R.A., Calderone, N.W., 2000. The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture* 128, 1–15.
- Müller M., 1997. What are the Microsporidia? *Parasitology Today* 13: 455-456.
- Muñoz, I., Cepero, A., Pinto, M.A., Martín-Hernández, R., Higes, M., De la Rúa, P., 2014. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution* 23:161–168.
- Muresan, E., Duca, D., Papay, Z., 1975. The study of some histochemical incides of the midgut, healthy and infected with *Nosema apis*, of the *Apis mellifica carpatica* bee. En: *Proceedings XXVth International Apicultural Congress, Munich*, 384-385.
- Mutinelli, F., 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 30, 257-271.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H., Moran, N., Hattori, M., 2006. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont Carsonella. *Science* 314 (5797): pp. 267. PMID 17038615.
- Nakjang, S., Tom A. Williams, T.A., Heinz, E., Watson, A.K., Foster, P.G., Sendra, K.M., Heaps, S.E., Hirt, R.P., Embley, T.M., 2013. Reduction and expansion in microsporidian

- genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome Biology and Evolution* 5:2285–2303.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39: 121–152.
- Nassonova, E.S., Smirnov, A.V., 2005. Synaptonemal complexes as evidence for meiosis in the life cycle of the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli*. *European Journal of Protistology* 41: 175-181.
- Naug, D., Gibbs, A., 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40:595-599.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39, 121-152.
- Nowrousian, M., Stajich, J.E., Chu, M., Engh, I., Espagne, E., Halliday, K., Kamerewerd, J., Kempken, F., Knab, B., Kuo, H.C., Osiewacz, H.D., Pöggeler, S., et al. (6 co-autores), 2010. De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. *PLoS Genetics* 6:e1000891.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 103-116.
- Office International des Epizooties (OIE), 2008. Manual of standards for diagnostic test and vaccines, <http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/2008>.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T., Paxton, R.J., 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54:103-109.

- Pajuelo, A.G, Torres, C., Orantes, F.J., 2008. Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Research*, 47: 84-86.
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouzé, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otillar, R., et al. (26 co-authors), 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:7705–7710.
- Pan, G., Xu, J., Li, T., Xia, Q., Liu, S-L., Zhang, G., Li, S., Li, C., Liu, H., Yang, L., Liu, T., Zhang, X., et al. (21 co-authors), 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics* 2013 14:186. doi:10.1186/1471-2164-14-186
- Parisot, N., Pelin, A., Gasc, C., Polonais, V., Belkorchia, A., Panek, J., Alaoui, H.E., Biron, D.G., Brasset, E., Vaury, C., Peyret, P., et al., 2014. Microsporidian Genomes Harbor a Diverse Array of Transposable Elements that Demonstrate an Ancestry of Horizontal Exchange with Metazoans. *Genome Biology and Evolution* 6(9):2289–2300.
- Parkin, E.J., Butlin, R.K., 2004. Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1595-1601.
- Parlamento Europeo, 2010. La salud de las abejas melíferas. COM (2010) 714 final, http://ec.europa.eu/food/archive/animal/liveanimals/bees/docs/honeybeehealth_communication_es.pdf.
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558–565.

Petrov, D., 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. Trends in Genetics 17:23-28.

Peyretailade, E., Biderre, C., Peyret, P., Duffieux, F., Méténier, G., Gouy, M., Michot, B., Vivarès, C.P., 1998. Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and LSU rRNA reduced to the universal core. Nucleic Acids Research 26: 3513-20.

Pilley, B.M., 1976. A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporidia) for *Nosema necatrix* Kramer 1965: pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology 28: 177-183.

Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C., Higes, M., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera, Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emergent pathogen of honey bees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology Reports 1: 131-135.

Pombert, J.F., Selman, M., Burkia, F., Bardella, F.T., Farinell, L., Solter, L.F., Whitman, D.W., Weiss, L.M., Corradi, N., Keeling, P.J., 2012. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A. 109:12638–12643.

Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees beekeepers in Europe. Journal of Apicultural Research, 49(1):15-22.

Raikov, I., 1982. Cell Biology Monographs, vol. 9. The protozoan Nucleus, morphology and evolution. Springer-Verlag, Vienna.

- Ramesh, M.A., Malik, S.B., Logsdon, J.M. Jr., 2005. A phylogenomic inventory of meiotic genes: evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology* 15:185–191.
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., de Graaf, D.C., 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* 8(8): e72443. doi:10.1371/journal.pone.0072443
- Refardt, D., Canning, E.U., Mathis, A., Cheney, S.A., Lafranchi-Tristem, N.J., Ebert, D., 2002. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Parasitology* 124:381-389.
- Refardt, D., Mouton, L., 2007. Reverse arrangement of rRNA subunits in the microsporidium *Glugoides intestinalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54, 83-85.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1:S96-119. doi: 10.1016
- Roudel, M., Aufauvre, J., Corbara, B., Delbac, F., Blot, N., 2013. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology* 140: 1346–1356.
- Rutrecht, S.T., Klee, J., Brown, M.J.F., 2007. Horizontal transmission success of *Nosema bombi* to its adult bumble bee hosts: effects of dosage, spore source and host age. *Parasitology* 134: 1719-1726.
- Sagastume, S., del Águila, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N., 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honey bees. *Environmental Microbiology* 13: 84-95.

- Sagastume, S., Martín-Hernández, R., Higes, M., Henriques-Gil, N., 2014a. Ribosomal Gene Polymorphism in Small Genomes: Analysis of Different 16S rRNA Sequences Expressed in the Honeybee Parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61: 42-50.
- Sak, B., Kvac, M., Petrzelkova, K., Kvetonova, D., Pomajbikova, K., Mulama, M., Kiyang, J., Modrý, D., 2011. Diversity of microsporidia (Fungi: Microsporidia) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitologica* 58: 81–86.
- Santin, M., Fayer, R., 2009. *Enterocytozoon bieneusi* Genotype Nomenclature Based on the Internal Transcribed Spacer Sequence: A Consensus. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 34–38.
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Shaw, A.P., Moura, H., Visvesvara, G.S., 1999. Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia infected host. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 34S–35S.
- Selman, M., Corradi, N., 2001. Horizontal gene transfers in vicious parasites. *Mobile Genetic Elements* 1(4): 251-255.
- Schoch, C.I., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Sponge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., *et al.* (Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List), 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109:6241-6246.
- Schurko, A.M., Neiman, M., Logsdon, J.M. Jr., 2009. Signs of sex: what we know and how we know it. *Trends in Ecology and Evolution* 24:208–217.

- Slamovits, C.H., Williams, B.A., Keeling, P.J., 2004a. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51:207-213.
- Slamovits, C.H., Fast, N.M., Law, J.S., Keeling, P.J., 2004b. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Current Biology* 14: 891–896.
- Smith, J.E., Dunn, A.M., 1991. Transovarial transmission. *Parasitology Today* 7: 146,148.
- Smith, M.L., 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS One*, 7(8): e43319.
- Sprague V., 1977. Classification and phylogenie of the Microsporidia. In: Bulla LE, Cheng TC, Eds. *Comparative Pathobiology*. Vol.2. New York, USA: Plenum Press 1977; pp. 1-30.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I., 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology* 18: 285–395.
- Stokstad, E., 2007. Genomics. Puzzling decline of U.S. bees linked to virus from Australia. *Science* 317(5843):1304-5.
- Szumowski, S.C., Estes, K.A., Troemel, E.R., 2012. Preparing a discreet escape. Microsporidia reorganize host cytoskeleton prior to non-lytic exit from *C. elegans* intestinal cells. *Worm* 1:4, 207-211.
- Tay, W.T., O'Mahony, E.M., Paxton, R.J., 2005. Complete rRNA gene sequence reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus spp.*) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 505–513.

- Tsai, S.J., Kou, G.H., Yamane, S., Lo, C.F., Wang, C.H., 2003. The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83: 51-59.
- Terry, R.S., Smith, J.E., Dunn, A.M., 1998. Impact of a novel, feminising microsporidium on its crustacean host. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45(5): 497-501.
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R., Goldberg, A.V., Lucocq, J.M., Hirt, R.P., Embley, T.M., 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 453:553–556.
- Ueno, R., Huss, V.A., Urano, N., Watabe, S., 2007. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single *Prototheca* strain. *Microbiology* 153:3879-3893.
- Van der Zee, R., Gómez-Moracho, T., Pisa, L., Sagastume, S., García-Palencia, P., Maside, X., Bartolomé, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2014. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports* doi:10.1111/1758-2229.12133.
- vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical Review of Managed honey bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1): S80-95.
- Vávra, J., 1965. Étude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques microsporidies. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 261: 3467-3470.

- Vávra, J., 1976. Structure of the Microsporidia. In: L.A. Bulla, Jr. and T.C. Cheng (Eds.), Comparative Pathobiology. Vol. 1. Biology of the Microsporidia. Plenum Press, N.Y., London, pp. 1–86.
- Villeneuve, A.M., Hillers, K.J., 2001. Whence meiosis? Cell 106:647–650.
- Vivares, C., Biderre, C., Duffieux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Metenier, G., Pages, M., 1996. Chromosomal localization of five genes in *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Journal of Eukaryotic Microbiology 43, 97S.
- Vivares, C.P., Gouy, M., Thomarat, F., Metenier, G., 2002. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. Current Opinion in Microbiology 5:499-505.
- Vossbrinck, C.R., Woese, C.R., 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. Nature 320:287-8.
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Woese, C.R., 1987. Ribosomal RNA sequences suggests microsporidio are extremely ancient eukaryotes. Nature, 326: 411-4.
- Weiss, L.M. y Becnel, J.J., 2014. Microsporidia: Pathogens of Opportunity. (Eds). Wiley Blackwell Press, 2014.
- Weiss, L.M., Vossbrinck, C.R., 1998. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. Adv. Parasitology 40: 351-395.
- Weedall, R.T., Robinson, M., Smith, J.E., Dunn, A.M., 2006. Targeting of host cell lineages by vertically transmitted, feminising microsporidia. International Journal for Parasitology 36: 749–756.

- Whitaker, J., Szalanski, A.L., Kence, M., 2011. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie* 42: 174–180.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K., 2003. Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology* 67: 360-375.
- Wilkinson, T.J., Rock, J., Whiteley, N.M., Ovcharenko, M.O., Ironside, J.E., 2011. Genetic diversity of the feminising microsporidian parasite *Dictyocoela*: New insights into host-specificity, sex and phylogeography. *International Journal for Parasitology* 41: 959–966.
- Williams, B.A., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., Embley, T.M., 2002. A mitochondrial remanent in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418: 865-869.
- Williams, B.A., Slamovits, C.H., Patron, N.J., Fast, N.M., Keeling, P.J., 2005. A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 10936-10941.
- Williams, B.A., Lee, R.C., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Fast, N.M., et al., 2008a. Genome sequence surveys of *Brachiola algerae* and *Edhazardia aedis* reveal microsporidio with low gene densities. *BMC Genomics* 9: 200.
- Williams, B.A., Cali, A., Takvorian, P.M., Keeling, P.J., 2008b. Distinct localization patterns of two putatively mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 131-133.
- Williams, G.R., Shafer, A.B., Rogers, R.E.L., Shutler, D., Stewart, D.T., 2008c. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 189–192.

- Williams, B.A., 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology* 11(11): 1551-1560.
- Wittner, M., Weiss, L.M., 1999. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC, USA: ASM press.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. & Noller, H. F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiology Review*, 47:621–669.
- Wolf, S., McMahon, D.P., Lim, K.S., Pull, C.D., Clark, S.J., Paxton, R.J., Osborne, J.L., 2014. So Near and Yet So Far: Harmonic Radar Reveals Reduced Homing Ability of *Nosema* Infected Honeybees. *PLoS ONE* 9(8): e103989.
- Wong, S., Fares, M.A., Zimmermann, W., Butler, G., Wolfe, K.H., 2003. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the “asexual” pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biology* 4:R10.
- Xiang, H., Pan, G., Vossbrinck, C.R., Zhang, R., Xu, J., Li, T., Zhou, Z., Lu, C., Xiang, Z., 2010. A tandem duplication of manganese superoxide dismutase in *Nosema Bombycis* and its evolutionary origins. *Journal of Molecular Evolution* 71:401
- Xu, Y., Weiss, L.M., 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology* 35: 941–953.
- Xu, J., Pan, G., Fang, L., Li, J., Tian, X., Li, T., Zhou, Z., Xiang, Z., 2006. The varying microsporidian genome: existence of long-terminal repeat retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis*. *International Journal for Parasitology* 36:1049–1056.

Yoshiyama, M., Kimura, K., 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. Journal of Invertebrate Pathology 106: 263–267.

Zander, E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Leipziger Bienenztg 24: 147–150.